



HAL
open science

Recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques dans des cellules mononucléées du sang périphérique, chez des patients atteints de cancers traités par sunitinib ou nivolumab : intérêt de l'approche kinomique

Gaëlle Noé

► **To cite this version:**

Gaëlle Noé. Recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques dans des cellules mononucléées du sang périphérique, chez des patients atteints de cancers traités par sunitinib ou nivolumab : intérêt de l'approche kinomique. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB169 . tel-04483954

HAL Id: tel-04483954

<https://theses.hal.science/tel-04483954>

Submitted on 29 Feb 2024

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DE PHAMACIE DE PARIS

ECOLE DOCTORALE 563

« MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE, IMAGERIES »

Thèse de doctorat de l'**Université Paris Descartes**

Spécialité : Pharmacologie

Présenté par **Gaëlle NOÉ**

Recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques dans des cellules mononucléées du sang périphérique, chez des patients atteints de cancers traités par sunitinib ou nivolumab. Intérêt de l'approche kinomique.

Thèse effectuée sous la direction du Pr. Michel VIDAL

Soutenue le 30 novembre 2016

Membres du jury :

M. le Professeur	Alexandre EVRARD	Rapporteur
M. le Professeur	Christophe TOURNIGAND	Rapporteur
M. le Professeur	François GOLDWASSER	Examineur
M. le Professeur	Gilles FAVRE	Examineur
M. le Docteur	Benoît BLANCHET	Examineur
M. le Professeur	Michel VIDAL	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A la Fondation Martine Midy qui m'a accordé un an de bourse, sans laquelle ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

A Monsieur le Professeur Alexandre Evrad

Pour l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de ce travail et je suis très sensible à la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger mon travail. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements et soyez assuré de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Christophe Tournigand

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse. Recevez ici l'expression de toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Gilles Favre

qui m'honore en acceptant de siéger dans ce jury de thèse. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour sa disponibilité et son déplacement à Paris.

A Monsieur le Professeur François Goldwasser

Je vous remercie de siéger au sein de ce jury de thèse. Vos conseils ont plus d'une fois joués un rôle déterminant dans l'avancée de ce travail. En cela je vous adresse toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Michel Vidal

Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet passionnant et de m'avoir fait confiance lors de ce travail.

A Benoît Blanchet

Pour avoir accepté de m'encadrer pour travail. Pour ton soutien, ta disponibilité, tes conseils et ton optimisme inébranlable. Je tiens à te remercier de la confiance que tu m'as accordée durant tout ce temps. Merci pour tout ce que tu m'as appris, d'un point de vu humain et professionnel.

A Audrey Thomas-Schoemann

Pour ton soutien et ton écoute sans faille. Pour tout ce que tu m'as apporté et pour tout ce qu'on a partagé ces trois dernières années, d'un point de vu professionnel et personnel. Ton amitié est importante à mes yeux.

To Faris Naji

I would like to thank you for everything that you taught me and for been there when I needed help. You optimism and great sense of humour carried me forward. It was nice working with you and I learnt a great deal from you for which I'm ever so grateful. Thanks once again and I hope to see you in the near future.

To Savithri Rangarajan

I deeply thank you for all the things I have learned from you. Thank you for your availability, your helpful advises and for your dynamism. I really enjoyed working with you.

A Audrey Bellesoeur

Pour ces premiers pas ensemble dans la kinomique et pour ton aide précieuse. J'espère pouvoir retravailler avec toi dans l'avenir.

A toute l'équipe de Cochin :

Xavier, Le chef, Halim, Laurence, Alicja, Christophe,

Je vous remercie pour votre accueil, votre bienveillance, vos conseils, pour votre soutien et également pour les bons moments partagés durant ces dernières années. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je suis très heureuse d'avoir eu la chance de travailler avec vous tous. Remerciements particuliers à Laurence pour tes relectures !

Je n'oublie pas *Philippe, Nadia, Claire, Gary, Alain, Maria, Pascale, Francesca, Marie-Chrsitine, Patricia*, vous êtes le cœur de ce laboratoire. J'ai énormément appris grâce à vous, que ce soit d'un point de vue humain ou professionnel. J'ai partagé de très bons moments et j'ai toujours pu trouver une oreille attentive en pièce d'extraction lors des passages plus difficiles de ma thèse ! Merci à vous tous.

A mes amis

Ceux du sud bien entendu! Ceux de la fac. Ceux rencontrés au cours de mon internat. Ceux rencontrés ailleurs...Particulièrement Claire, Simon, Sylvia, Bibou, Sophie, Morgane, Marion,

Marjo, Nathaniel, et mes coloc, pour votre soutien et votre disponibilité lorsque j'avais besoin de décompresser!!

A mes parents, mes frères et soeurs

Pour votre présence et votre patience tout au long de ces années d'études. Pour avoir toujours cru en moi, malgré mes doutes. Une pensée particulière pour mon coloc : pour cette année partagée avec toi. J'ai pu apprendre à te connaître vraiment et tu m'as beaucoup apporté pendant cette année passée ensemble, merci.

A Charline

Pour cette amitié qui ne saurait cesser malgré le temps et la distance.

A Chloé

Pour avoir été toujours disponible pour moi. Pour tous les moments qu'on a pu partager et pour ceux à venir.

A Aude

Pour cette belle rencontre et pour toutes les étapes que nous avons franchies ensemble, main dans la main.

A Marion

Pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Pour notre amitié inestimable à mes yeux.

A Pierre

Pour ta patience et ton soutien sans limite. Pour tous ces merveilleux moments passés à tes côtés.

*La vie, ce n'est pas d'attendre que l'orage passe,
c'est d'apprendre à danser sous la pluie.*

-Sénèque

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1 : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PAR APPROCHE KINOMIQUE DANS LE CANCER	18
1 PROTEINES KINASES ET ONCOGENESE	18
1.1 Kinome	18
1.2 Classification des protéines kinases	20
1.3 Protéines kinases et transduction du signal	21
1.4 Rôle des protéines kinases dans le développement tumoral	23
1.4.1 Mécanisme moléculaire d'oncogenèse	23
1.4.2 Protéines kinases et cancer	25
1.5 Microenvironnement tumoral et angiogenèse tumorale	26
1.6 Échappement au système immunitaire	28
1.6.1 Immunosurveillance et immunoediting	28
1.6.1.1 Concept d'immunosurveillance	28
1.6.1.2 Echappement immunitaire ou « immunoediting »	29
1.6.2 Points de contrôle et régulation du système immunitaire	31
1.6.2.1 La réponse immunitaire anti-tumorale	31
1.6.2.2 Le récepteur PD-1 et tolérance immunitaire	32
1.7 Stratégies thérapeutiques en oncologie	33
1.7.1 Thérapies ciblant les protéines kinases	34
1.7.1.1 Addiction oncogénique	34
1.7.1.2 Anticorps monoclonaux	34
1.7.1.3 Les inhibiteurs de protéines à activité kinase	35
1.7.2 Les immunothérapies	36
1.7.3 Problématiques des thérapies ciblées	37
2 IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS ET APPROCHE KINOMIQUE	38
2.1 Généralités sur les biomarqueurs	38
2.2 Biomarqueurs en cancérologie	39

2.2.1	Nécessité de biomarqueurs	40
2.2.2	Biomarqueurs de l'angiogenèse	41
2.2.3	Biomarqueurs et immunothérapies	42
2.3	Intérêt de la kinomique	43
2.3.1	Généralités sur l'approche kinomique	45
2.3.1.1	Principe de l'approche kinomique par peptide array	46
2.3.1.2	La technologie PamGene®	46
2.3.2	Approche kinomique en cancérologie fondamentale	48
2.3.3	Recherche de biomarqueurs par approche kinomique	49
2.3.4	Intérêt des cellules mononucléées du sang périphérique pour la recherche de biomarqueurs	51
CHAPITRE 2 : ENJEUX DE DEUX NOUVELLES THERAPIES CIBLEES ANTITUMORALES : LE SUNITINIB ET LE NIVOLUMAB		56
1	LE SUNITINIB DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU REIN METASTATIQUE	56
1.1	Généralités sur le cancer du rein	56
1.1.1	Epidémiologie	56
1.1.2	Types histologiques	56
1.1.3	Physiopathologie du cancer du rein	57
1.1.3.1	Anomalies moléculaires dans le cancer du rein	57
1.1.4	Prise en charge thérapeutique	59
1.1.4.1	Le score de Heng	59
1.1.4.2	Les thérapies ciblées	60
1.1.5	L'immunothérapie	62
1.2	Le sunitinib	63
1.2.1	Structure chimique	63
1.2.2	Activité pharmacologique	64
1.2.3	Indications thérapeutiques	64
1.2.4	Pharmacocinétique	65
1.2.5	Efficacité clinique	66
1.2.6	Tolérance	67
1.2.7	Relation pharmacocinétique - pharmacodynamie	68
1.2.7.1	Efficacité	68
1.2.7.2	Toxicité	69
1.2.8	Variabilité interindividuelle de réponse	69
1.2.8.1	Facteurs de variabilité pharmacocinétique	70
1.2.8.2	Résistance au sunitinib	72
1.2.9	Suivi thérapeutique pharmacologique	73
1.2.10	Biomarqueurs et sunitinib	74

2	LE NIVOLUMAB CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES	76
2.1	Généralités sur le cancer bronchique non-à petites cellules	76
2.1.1	Epidémiologie	76
2.1.2	Types histologiques	76
2.1.3	Anomalies moléculaires	77
2.1.3.1	Mutation de l'EGFR	77
2.1.3.2	Réarrangement de ALK	78
2.1.3.3	Autres mutations	78
2.1.3.4	Recommandations	79
2.1.4	Prise en charge thérapeutique	79
2.1.4.1	Stades précoces ou localement avancés	79
2.1.4.2	Stades métastatiques	79
2.2	Le nivolumab	84
2.2.1	Structure	84
2.2.2	Activité pharmacologique	84
2.2.3	Indications	85
2.2.4	Propriétés pharmacocinétiques	85
2.2.5	Efficacité Clinique dans le cancer du poumon	87
2.2.6	Toxicité	88
2.2.7	Relation PKPD	89
2.2.8	Les enjeux du nivolumab	89
2.2.8.1	Evaluation de la réponse	89
2.2.8.2	Associations thérapeutiques	90
2.2.8.3	Facteurs prédictifs de la réponse	91
	CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	98
	CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	106
1	ARTICLE 1 : IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PHARMACODYNAMIQUES DU SUNITINIB	106
1.1.1	Introduction et objectifs	106
1.1.2	Matériels et méthodes	107
1.1.2.1	Etude clinique rétrospective	107
1.1.2.2	Etude kinomique prospective	107
1.1.3	Résultats	108
1.1.3.1	Etude rétrospective préliminaire	108
1.1.3.2	Etude kinomique prospective	108
1.1.4	Discussion	109

2	RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PHARMACODYNAMIQUES DU NIVOLUMAB	126
2.1	Article 2 : Mise au point et validation du dosage du nivolumab par une technique ELISA	126
2.1.1	Introduction et objectif	126
2.1.2	Matériels et méthodes	127
2.1.3	Résultats	128
2.1.4	Discussion	129
2.2	Article 3 : Effets du nivolumab <i>in vivo</i> sur les kinases de CMSP	156
2.2.1	Introduction et objectifs	156
2.2.2	Matériels et méthodes	157
2.2.3	Résultats	157
2.2.3.1	Description de la cohorte	157
2.2.3.2	Analyse des profils kinomiques	157
2.2.3.3	Facteurs pronostic de la survie sans progression	158
2.2.4	Discussion	159
	CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	196
	CONCLUSION GENERALE	204
	BIBLIOGRAPHIE	206

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette	LT	Lymphocyte T
ABL	Abelson kinase		
ADN	Acide désoxyribonucléique	miRNA	micro ARN
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>	MPER	Mammalian Protein Extraction Reagent
AMM	Autorisation de mise sur le marché	mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
aPK	Atypical protein <i>kinases</i>		
ARNm	Acides ribonucléiques messagers	NCI-CTCAE	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
ASC	Aire sous la courbe		
ATP	Adénosine triphosphate	NK	Natural killer cell
BCRP	Breast cancer resistance protein	OMS	Organisation mondiale de la santé
BSA	Bovine saline albumin		
CAMK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	PD-1	Programmed death 1
		PDGF	Platelet derived growth factor
		PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
CBNPC	Cancer bronchique non-à petites cellules	PD-L1	Programmed death ligand 1
CBPC	Cancer bronchique à petites cellules	PgP	P-glycoprotéine
CCR	Carcinome rénal	PI3K	phosphoinositide 3-kinase
CCRcc	Carcinome rénal à cellules claires	PIGF	Placenta growth factor
CCRm	Carcinome rénal métastatique	PK/PD	Pharmacocinétique/ pharmacodynamique
CEC	Cellules endothéliales circulantes	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Cmax	Concentration maximale	PTK	Protéine tyrosine kinase
CMSP	Cellules mononucléées du sang périphérique		
		RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité		
CQ	Contrôle qualité	REMARK	Reporting recommendations for tumor marker
CRP	C-reactive protein		
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated	RTK	Récepteur tyrosine kinase
Protein 4			
CYP	Cytochrome P		
		Ser	Sérine/thréonine kinase
DC	Dendritic cell	SG	Survie globale
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SSP	Survie sans progression
		STK	Sérine/thréonin kinase
		STP	Suivi thérapeutique pharmacologique
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group	SU12662	Métabolite actif du sunitinib
EGFR	Epidermal growth factor receptor		
EMA	European Medicine Agency	TAA	Tumor-associated antigen
ePK	Eukaryotic protein <i>kinase</i>	TCR	T-cell receptor
		TGF	<i>Transforming growth factor</i>
FDA	Food and Drug Administration	Th1/Th2	T helper
FGF	Fibroblast growth factor	TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes
		TK	Tyrosine kinase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2	TNF	Tumor necrosis factor
		TNM	tumor node metastasis
HIF	Hypoxia inducible factor	Treg	T régulateur
		Tyr	Résidu tyrosine
IFN	Interferon		
Ig	Immunoglobuline	VEGF	vascular endothelial growth factor
IL	Interleukine	VEGFR	vascular endothelial growth factor
irAE	Immune-related adverse events	receptor	
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase	VHL	von Hippel Lindau
JNK	c-Jun N-terminal <i>kinases</i>		

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Schéma illustrant l'activité d'une tyrosine kinase.</i>	19
<i>Figure 2 : Phénomène de phosphorylation/déphosphorylation dans la transduction du signal, adapté depuis (Arena, Benvenuti, and Bardelli 2005).</i>	19
<i>Figure 3 : Arbre phylogénétique des 491 domaines ePK codés par 478 gènes, répartis en 9 groupes, d'après (Manning et al. 2002).</i>	21
<i>Figure 4 : Structure et activation d'un RTK, d'après (Blume-Jensen and Hunter 2001).</i>	22
<i>Figure 5 : Schématisation de la transduction du signal depuis l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau intracellulaire.</i>	23
<i>Figure 6 : Caractéristiques des cellules tumorales responsables du phénotype tumoral, d'après Hanahan et Weinberg (Douglas Hanahan and Weinberg 2011).</i>	25
<i>Figure 7 : Les récepteurs au VEGF et leurs ligands. Adapté d'après Lee M. Ellis & Daniel J. Hicklin (Hicklin 2004).</i>	27
<i>Figure 8 : Voies de signalisation du VEGFR. D'après Rivera S (Rivera et al. 2011).</i>	28
<i>Figure 9 : Les 3 phases de l'immunoediting tumoral, d'après (Schreiber, Old, and Smyth 2011a)</i>	30
<i>Figure 10 : Cycle cancer-immunité, d'après (D. S. Chen and Mellman 2013).</i>	32
<i>Figure 11 : Mécanisme d'action de l'axe PD-1 / PD-L1 dans la résistance immunitaire adaptative. Adapté depuis (Okazaki et al. 2013).</i>	33
<i>Figure 12 : Exemples de thérapies ciblées utilisées en cancérologie. D'après (Douglas Hanahan and Weinberg 2011).</i>	34
<i>Figure 13 : Profils d'affinité de différents inhibiteurs de tyrosine kinases pour le kinome, d'après (Karaman et al. 2008).</i>	36
<i>Figure 14 : Facteurs impliqués dans l'activité des kinases et techniques « omiques » (non exhaustif) utilisées pour la caractérisation des protéines kinases, adapté depuis (Sikkema et al. 2012).</i>	44
<i>Figure 15 : Principes de la phosphoprotéomique et de la kinomique, d'après (Sikkema et al. 2012)</i>	45
<i>Figure 16 : A. Puce à microarray de la société PamGene. B. Membrane poreuse d'un array, vue de dessus (à gauche) et vue en coupe transversale (à droite) ("Gershon D 2004 Nature 432 243-249," n.d.). C. L'échantillon est pompé activement de haut en bas à travers la membrane poreuse.</i>	47
<i>Figure 17 : Principes de détection de la phosphorylation des peptides sur les puces à microarrays PamChip[®] l'aide d'anticorps marqués par un fluorochrome.</i>	48
<i>Figure 18 : Mécanismes impliqués dans l'accumulation d'HIF, d'après (Cohen and McGovern 2005).</i>	58
<i>Figure 19 : Mécanisme d'action des thérapies ciblées dans le cancer du rein métastatique (Rini and Atkins 2009).</i>	61
<i>Figure 21 : Structure chimique du sunitinib.</i>	63
<i>Figure 21 : Voies de signalisation de l'EGFR, d'après (Janku, Stewart, and Kurzrock 2010).</i>	78

Figure 23 : Stratégies de prise en charge en première ligne des CBNPC épidermoïdes et non-épidermoïdes.

D'après (Novello et al., n.d.)..... 83

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Définition des biomarqueurs selon le National Institute of Health (NIH), d'après (Biomarkers Definitions Working Group 2001; Gruttola et al. 2001).</i>	39
<i>Tableau 2 : Différentes techniques peptides arrays commercialisés, d'après (Arsenault, Griebel, and Napper 2011)</i>	47
<i>Tableau 3 : Classification de Heng et survie globale (Heng et al. 2009).</i>	59
<i>Tableau 4 : Résumé de la stratégie thérapeutique médicamenteuse du carcinome rénal métastatique, selon les recommandations européennes.</i>	60
<i>Tableau 5 : Concentration de sunitinib capable d'inhiber 50 % de l'activité tyrosine kinase (IC₅₀) sur les principales protéines kinases cibles (Roskoski 2007).</i>	64
<i>Tableau 6 : Valeurs estimées des paramètres pharmacocinétiques du sunitinib et de son métabolite SU12662 (Houk et al. 2009).</i>	65
<i>Tableau 7 : Réponse tumorale et survie sans progression. Sunitinib versus IFNα, d'après Motzer et al (R. J. Motzer et al. 2009).</i>	66
<i>Tableau 8 : Effets indésirables du sunitinib les plus fréquents et gradés selon le NCI-CTCAE v 3.0, d'après Motzer et al (R. J. Motzer et al. 2009).</i>	68
<i>Tableau 9 : Paramètres pharmacocinétiques du nivolumab déterminés par une approche de pharmacocinétique de population (EMA 2015).</i>	86
<i>Tableau 10 : Association du statut PD-L1 avec le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale dans les différents essais du nivolumab.</i>	93

INTRODUCTION

La médecine personnalisée ou médecine de précision est aujourd'hui un enjeu majeur en oncologie. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en tenant compte des spécificités tumorales, biologiques ou environnementales du patient. Ces dernières décennies, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension et l'élucidation des processus impliqués dans l'oncogenèse. L'émergence de technologies innovantes (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique...) permettant une caractérisation moléculaire des tumeurs ainsi que le développement de bases de données à grande échelle (notamment avec le séquençage complet du génome) ont permis d'approfondir ces connaissances. Parallèlement, se sont développés des outils informatiques puissants pour l'analyse des données générées, qualifiées de « *big data* » à l'aide de ces technologies haut-débit. Ainsi, l'amélioration des connaissances moléculaires tumorales découlant de toutes ces avancées a permis l'identification de cibles biologiques conduisant à l'élaboration de nouvelles thérapies moléculaires ciblées, parmi lesquels les inhibiteurs de kinases et les immunothérapies. Si l'utilisation des inhibiteurs de kinases est devenue courante ces dernières années, celle des inhibiteurs de « *checkpoint* » (points de contrôle) immunitaires est actuellement en plein essor.

Ces deux familles de médicaments constituent une avancée majeure dans la prise en charge thérapeutique de divers cancers, en faisant preuve d'une efficacité notable tout en améliorant la qualité de vie des patients. Cependant, une variabilité interindividuelle de la réponse est observée chez les patients traités par ces molécules, résultant d'une résistance primaire ou d'un échappement au traitement. A cela s'ajoutent les effets indésirables qui peuvent s'avérer sévères dans certains cas, ainsi que le coût onéreux de ces thérapies. Dans ce contexte de médecine de précision, l'identification de biomarqueurs apparaît donc primordiale afin de prédire l'efficacité ou les toxicités induites par le traitement. Les biomarqueurs sont des paramètres biologiques qui peuvent aider au dépistage précoce d'une pathologie, réaliser un diagnostic précis, établir un pronostic, choisir un traitement adapté, prédire l'efficacité ou la survenue de toxicités. Ces marqueurs peuvent également être utilisés pour étudier les effets pharmacodynamiques d'un médicament sur sa cible, ainsi que pour le suivi thérapeutique.

L'approche kinomique est une technologie innovante de plus en plus utilisée dans la recherche de biomarqueurs réalisée à partir de tissu tumoral en oncologie. Le principe de la kinomique repose

sur la mesure de la phosphorylation de peptide-substrats de kinases afin d'en déduire l'activité de kinases. Etant donné que la recherche de biomarqueurs doit être simple, réalisable en routine et peu invasive pour le patient, l'utilisation du tissu tumoral comme matrice biologique est à ce jour l'un des facteurs limitant l'essor de l'approche kinomique en pratique clinique. Dans ce contexte, les cellules sanguines circulantes, et particulièrement les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP), représentent une matrice biologique d'intérêt pour se substituer au tissu tumoral. Le sunitinib (inhibiteur de tyrosine kinase à visée antiangiogénique) et le nivolumab (inhibiteur de *checkpoint*) ont permis de grandes avancées dans la prise en charge thérapeutique du cancer rénal métastatique et du cancer bronchique non-à petites cellules, respectivement. Par ailleurs, ces deux molécules présentent toutes les deux des propriétés immunomodulatrices. L'objectif de ce doctorat d'université a donc été d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de CMSP comme matrice biologique pour la recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques par approche kinomique chez des patients traités par sunitinib ou nivolumab.

Ce manuscrit débutera par une analyse bibliographique. Un premier chapitre abordera les notions générales de l'oncogénèse avec l'implication de l'angiogénèse et de l'échappement au système immunitaire et des thérapies qui en découlent. Dans ce premier chapitre, sera également décliné l'intérêt de l'approche kinomique pour la recherche de biomarqueurs. Le second chapitre de l'analyse bibliographique présentera l'utilisation du sunitinib dans le carcinome rénal métastatique et celle du nivolumab dans le cancer bronchique non-à petites cellules. Leurs mécanismes d'action, leurs propriétés pharmacocinétiques et un état des lieux concernant la recherche de biomarqueurs pour ces deux molécules seront décrits. Après une présentation de la problématique, les résultats obtenus lors des différents travaux de cette thèse seront présentés. Enfin, une discussion générale présentera une analyse critique de ce travail pour dégager ses atouts et ses faiblesses ainsi que les perspectives.

CHAPITRE 1

RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PAR APPROCHE KINOMIQUE DANS LE CANCER

CHAPITRE 1 : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PAR APPROCHE KINOMIQUE DANS LE CANCER

1 Protéines kinases et oncogénèse

1.1 Kinome

A l'instar du génome qui regroupe l'ensemble du matériel génétique d'un individu, le kinome représente l'ensemble des protéines kinases, enzymes capables de phosphoryler divers substrats. L'étude du kinome peut être envisagée soit sous l'angle de la protéomique (expression des protéines), soit sous l'angle de leur fonctionnalité. Nous nous placerons dans ce dernier contexte dans le cadre de cette thèse.

La famille des protéines kinases est l'une des plus larges familles de protéines humaines. Le phénomène de phosphorylation est un mécanisme bien décrit qui a suscité de nombreux travaux de recherche. En effet, la notion de « phosphoprotéines » existe depuis plus d'un siècle. Elles étaient alors considérées comme des transporteurs de nutriments. Lors des études sur la glycogène phosphorylase réalisées au cours des années 50 par Krebs et Fischer, les phosphoprotéines ont été identifiées comme étant des médiateurs impliqués dans la régulation des fonctions cellulaires. Ces travaux permettant l'isolement de la première protéine kinase, la phosphorylase kinase PHK, ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1992 ¹. Par ailleurs, Burnett et Kennedy ont décrit pour la première fois l'activité de phosphorylation en 1954 ². Un an plus tard, les travaux de Wosilait et Sutherland's ont démontré que l'activité de la glycogène phosphorylase est régulée grâce à l'ajout ou la perte d'un groupe phosphate. Cette découverte suggère alors que l'activité des enzymes peut être modulée via le mécanisme réversible de phosphorylation ³. Par la suite, les recherches sur le mécanisme de phosphorylation se sont multipliées, révélant l'importance de ce phénomène.

Les protéines kinases sont des phosphotransférases qui catalysent les réactions de phosphorylation par un transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP sur une protéine substrat possédant un groupement hydroxyle libre sur un résidu tyrosine (Tyr), sérine

(Ser) ou thréonine (Thr) ⁴ (Figure 1). Ces substrats peuvent être des récepteurs, des protéines de la signalisation, des canaux ioniques, des facteurs de transcription, et plus rarement des lipides, des sucres ou des nucléotides ⁴. Cette phosphorylation modifie la conformation, parfois la stabilité du substrat cible et par conséquent ses interactions et sa réactivité potentielle. Ce phénomène est transitoire et réversible grâce à l'intervention de phosphatases, modulant ainsi l'activité des substrats. La transduction du signal découle de ce phénomène de phosphorylation/déphosphorylation (Figure 2).

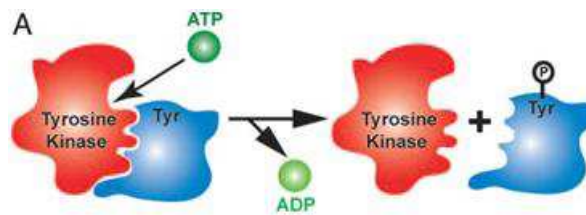


Figure 1 : Schéma illustrant l'activité d'une tyrosine kinase.

ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; Tyr : résidu tyrosine.

Les protéines kinases sont impliquées *via* ce phénomène de phosphorylation/déphosphorylation, dans la plupart des voies de signalisation, qui régulent les processus physiologiques cellulaires ⁵ tels que le métabolisme, la transcription, la croissance, la différenciation, la mobilité cellulaire et l'apoptose ⁶. Elles jouent également un rôle majeur dans la communication intercellulaire pendant le développement, les réponses physiologiques et l'homéostasie, ou encore dans le fonctionnement des systèmes nerveux et immunitaire ⁷. Par conséquent, des mutations ou dérégulations de ces kinases contribuent au développement de nombreuses pathologies, notamment des cancers ^{8,9}.

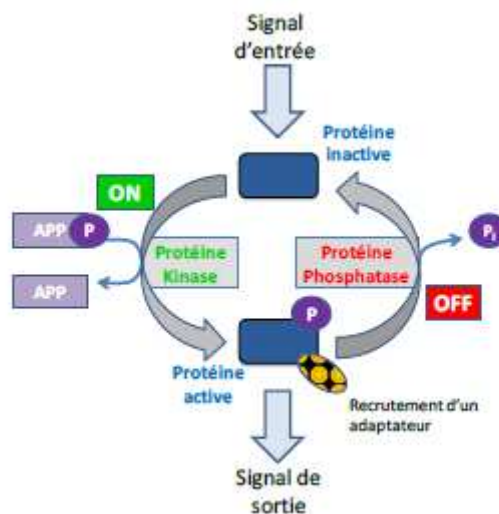


Figure 2 : Phénomène de phosphorylation/déphosphorylation dans la transduction du signal, adapté depuis ⁴.

Le séquençage du génome associé aux recherches de Hank et Hunter ¹⁰ et de Manning *et al.* ont permis d'identifier 518 gènes codant des kinases. Ces différents gènes représentent près de 1,7 % du génome humain ⁷. Ce nombre, particulièrement important, souligne la place centrale de cette famille. De plus, il est estimé que plus de 75 % du protéome humain est phosphorylé par ces enzymes, faisant de la phosphorylation un des processus post-traductionnel les plus importants ¹¹.

1.2 Classification des protéines kinases

Les protéines kinases peuvent être classées de différentes manières. La plus ancienne, décrite en 1995 par Hanks et Hunter ¹⁰, repose sur l'homologie ou le degré de similitude du domaine à activité kinase. Deux superfamilles ont été ainsi identifiées. Les protéines kinases eucaryotiques (ePK), codées par 478 gènes, présentent une similitude de leur domaine catalytique. Néanmoins, l'identification de légères variations au sein de ce dernier a permis de déterminer 9 groupes phylogénétiques au sein de cette superfamille (Figure 3). La seconde superfamille est celle des protéines kinases atypiques (aPK), codées par 40 gènes. Ces dernières ont un domaine kinase différent de celui des ePK mais possèdent tout de même une activité enzymatique ⁷.

La seconde méthode de classification s'appuie sur la nature du résidu phosphorylé. Ainsi deux grandes familles de kinases sont distinguées : les sérine/thréonine kinases (STK) et les tyrosine kinases (TK). Il existe également des enzymes, plus rares, qui ont la capacité de phosphoryler aussi bien les résidus Tyr que les résidus Ser ou Thr, la plus connue étant la protéine MEK ¹².

Les STK représentent la majorité des protéines kinases (~80 %) parmi lesquelles sont retrouvées les protéines kinases A, C et G (PKA, PKC, PKG), les protéines kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (CAMK), les MAP kinases (MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*) et GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) ¹³. Les TK, quant à elles, sont subdivisées en deux groupes : les protéines cytoplasmiques incluant entre autres Src (kinase isolée depuis le virus *Rous Sarcoma*), ABL (*Abelson kinase*) et JAK (Janus kinase) et les récepteurs transmembranaires (RTK) tels que VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) et EGFR (*epidermal growth factor receptor*).

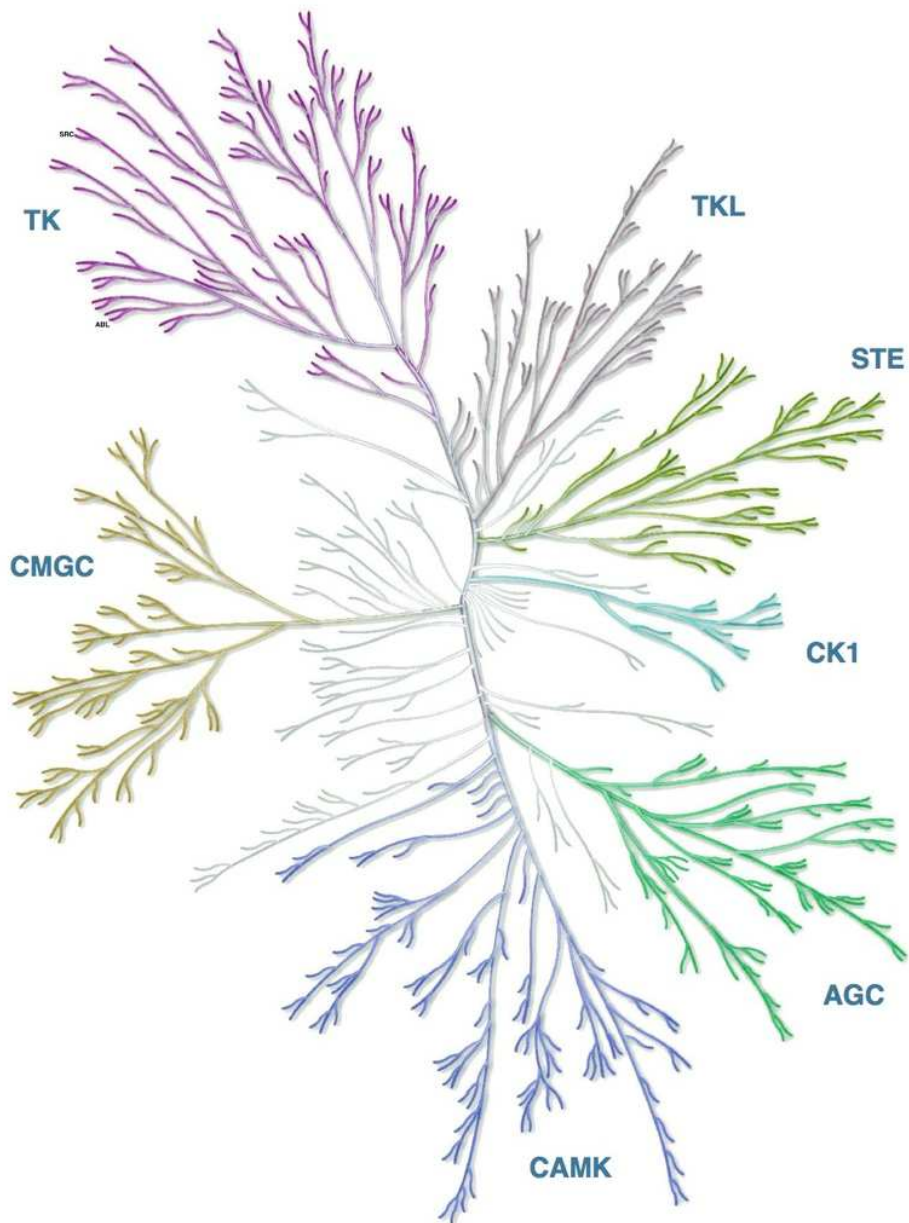


Figure 3 : Arbre phylogénétique des 491 domaines ePK codés par 478 gènes, répartis en 9 groupes, d'après 7.

Le groupe « autres » est représenté par les branches les plus claires. CMGC : Contenant les kinases CDK, MAPK, GSK3, CLK ; CAMK : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ; AGC : Contenant les familles PKA, PKG, PKC ; CK1 : Casein kinase 1 ; STE : Homologs of yeast Sterile 7, 11 and 20 kinases ; TKL : Tyrosine kinase-like ; TK : Tyrosine kinase ; RGC : Receptor Guanylate Cyclase.

1.3 Protéines kinases et transduction du signal

Les RTK sont formés par un domaine extracellulaire où se fixe le ligand, un segment transmembranaire, un domaine kinase intracellulaire composé d'une boucle N-terminale où se fixe l'ATP, et d'une boucle d'activation C-terminale dotée d'une activité phospho-transférase et un domaine de régulation allostérique qui module l'activité catalytique¹⁴. En absence de ligand, la

boucle d'activation empêche l'ATP de se fixer sur la boucle N-terminale et inhibe par conséquent l'activité catalytique (Figure 4).

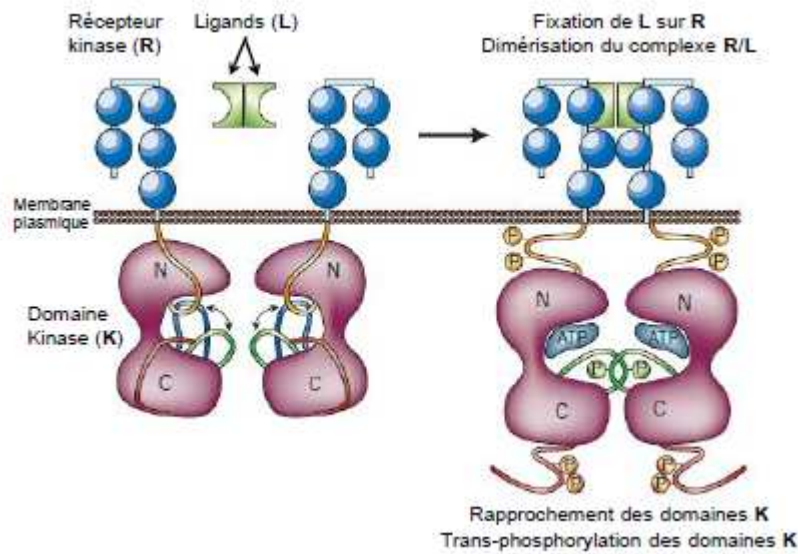


Figure 4 : Structure et activation d'un RTK, d'après ¹⁵.

Gauche : en l'absence de stimulation, le récepteur est dans une conformation qui empêche l'activité kinase.

Droite : en présence de ligand, le complexe ligand-récepteur se dimérise. La conformation du récepteur devient active, permettant ainsi l'autophosphorylation du domaine kinase. Bleu : conformation de la boucle d'activité empêchant la fixation du substrat. Vert : conformation permettant la fixation du substrat. Les régions juxtamembranaire (orange) et C-terminale (rouge) participent à la conformation du lobe N et à l'accès du substrat.

A l'état physiologique, la fixation d'un ligand au domaine extracellulaire des RTK résulte en la dimérisation du récepteur. Ceci entraîne un changement de conformation du récepteur induisant l'activation des domaines kinases et engendre une trans-autophosphorylation de résidus tyrosine des domaines intracytoplasmiques des récepteurs. Les tyrosines phosphorylées sur ces récepteurs vont ensuite recruter des protéines intermédiaires de la signalisation, *via* la liaison à des domaines SH2 (*Src Homology 2*) ou des domaines de liaison phosphotyrosine PTB (*phosphotyrosine binding domains*). Cette fixation est suivie d'une activation par phosphorylation. Parmi ces protéines sont retrouvées en grand nombre des kinases cytoplasmiques qui vont à leur tour activer d'autres protéines par phosphorylation. Ainsi, une cascade de signalisation intracellulaire est mise en place (Figure 5) ^{15,16}.

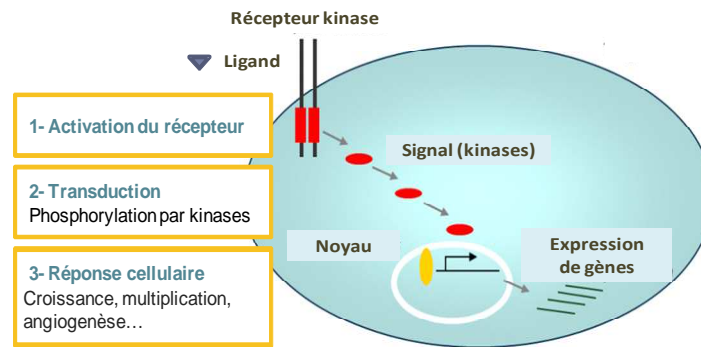


Figure 5 : Schématisation de la transduction du signal depuis l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau intracellulaire.

1.4 Rôle des protéines kinases dans le développement tumoral

1.4.1 Mécanisme moléculaire d'oncogenèse

La progression tumorale implique de nombreux mécanismes qui font suite à l'accumulation d'altérations de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du maintien de l'intégrité génétique. Trois types de gènes contribuent au développement d'une tumeur.

Les proto-oncogènes sont des gènes dominants ¹⁷ qui acquièrent un pouvoir transformant suite à des modifications quantitatives ou qualitatives pour devenir des oncogènes ¹⁸. A l'état normal, les proto-oncogènes codent pour des protéines impliquées dans divers mécanismes physiologiques de la cellule, tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la sénescence ou la mort. Leur activation en oncogène, à la suite d'une délétion ou mutation ponctuelle, d'amplification génique ou d'une translocation chromosomique, génère en permanence des oncoprotéines activatrices du cycle cellulaire aboutissant à une croissance et une différenciation cellulaire incontrôlées ¹⁷. Ces oncoprotéines peuvent être des facteurs de croissance, des RTK, des protéines kinases cytosoliques, des protéines membranaires liant le GTP ou encore des protéines à activité nucléaire.

Les gènes suppresseurs de tumeur sont des gènes récessifs ¹⁷ qui codent pour des protéines onco-suppressives (comme la protéine p53 ou Rb) qui régulent négativement le cycle cellulaire et induisent l'apoptose. Toute inactivation d'un de ces gènes entraîne une perte de fonction onco-suppressive et favorise par conséquent la prolifération cellulaire et le développement tumoral ¹⁷.

Enfin, **les gènes de réparation de l'ADN** interviennent indirectement dans le processus d'oncogenèse, mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

Le développement d'une tumeur est donc dépendant de l'instabilité génétique qui favorise l'émergence d'altérations moléculaires, pouvant procurer aux cellules un avantage sélectif en termes de survie, de prolifération et de dissémination métastatique. Hanahan et Weinberg ont répertorié l'ensemble des processus responsables du phénotype tumoral sous le nom de "*Hallmarks of cancer*" (Figure 6). Ils incluent l'acquisition de capacités anormales de division et une indépendance vis-à-vis des signaux inhibiteurs de prolifération, un échappement au processus de vieillissement cellulaire, à l'apoptose et à la réponse immunitaire, une capacité à induire la formation de nouveaux vaisseaux spécifiques à la tumeur (néoangiogenèse) et des capacités d'invasion et de dissémination à distance (métastases)^{19,20}. Ces mécanismes vont être accomplis à la faveur d'altérations au niveau des cascades de signalisation intracellulaire. Les protéines kinases, étant des régulateurs majeurs de ces voies, jouent par conséquent un rôle clé dans le processus d'oncogenèse.

Par ailleurs, il est important de souligner que parmi les gènes identifiés comme étant impliqués dans le cancer, les gènes de kinases sont fréquemment retrouvés (27 sur 291 gènes du cancer)²¹.

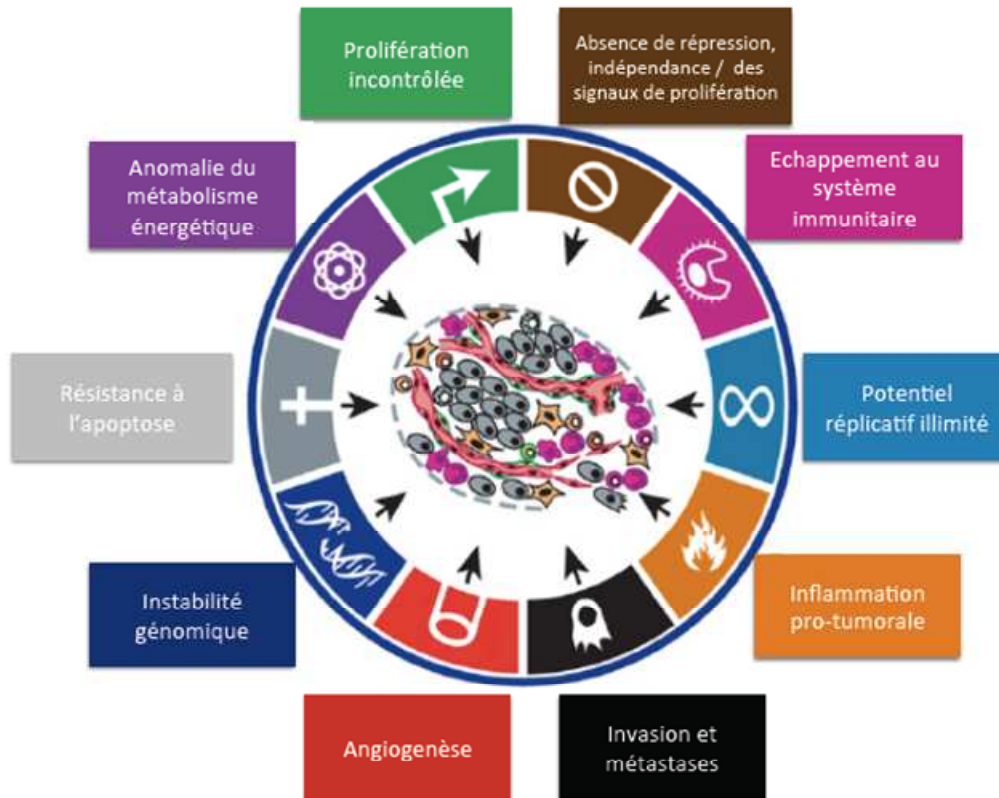


Figure 6 : Caractéristiques des cellules tumorales responsables du phénotype tumoral, d'après Hanahan et Weinberg²⁰.

1.4.2 Protéines kinases et cancer

Les kinases sont des régulateurs importants des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques indispensables à la cellule. En temps normal, leur activité est très contrôlée et régulée par des mécanismes d'autocontrôle assurant l'inhibition des domaines catalytiques. Toute dérégulation de l'activité kinase engendre donc une perturbation de la signalisation à l'origine du développement tumoral²².

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la dérégulation de l'activité kinase^{15,23}. Les **altérations génétiques** peuvent avoir pour conséquence de modifier et altérer la structure de la protéine. Ainsi des translocations chromosomiques peuvent générer des protéines de fusion oncogéniques ayant une activité TK, comme c'est le cas dans la leucémie myéloïde chronique qui porte la translocation t(9 ;22) conduisant au gène de fusion *Bcr/Abl*, qui code une protéine cytosolique à activité kinase (Bcr/Abelson)²⁴.

Des mutations de type gain de fonction, telles que des délétions, des insertions ou des mutations ponctuelles peuvent perturber l'autorégulation des kinases. Par exemple, dans la leucémie myéloïde aigüe, la mutation du récepteur Fms-like tyrosine kinase (FLT3) entraîne une activation

constitutive du RTK même en l'absence de ligand ²⁵. Dans le mélanome, la mutation du gène BRAF, retrouvée dans plus de 60 % des cas ²⁶, résulte en une activation constitutive de la STK. Le 3^{ème} mécanisme de dérégulation des kinases est la **surexpression** de protéines liée à une amplification génique, avec pour exemple le cancer du sein qui surexprime le récepteur HER2. Enfin, une augmentation de l'activité des kinases peut être le résultat d'une **perte de fonction** d'une protéine inhibitrice telle que la tyrosine phosphatase, PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog*), dans de nombreuses tumeurs solides ²⁷.

1.5 Microenvironnement tumoral et angiogénèse tumorale

Les cellules tumorales se localisent au sein d'un microenvironnement appelé « stroma tumoral ». Ce dernier est composé de la matrice extracellulaire et d'une composante cellulaire comprenant des fibroblastes associés à la tumeur, des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles), des lymphocytes, des cellules dérivées de la moelle osseuse, des précurseurs angiogéniques (cellules endothéliales et péricytes).

Pour pouvoir croître au-delà d'un certain volume ($>1-2 \text{ mm}^3$), une tumeur a besoin de développer son propre réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est appelé l'angiogénèse. Cette dernière va permettre d'augmenter l'apport des nutriments et de l'oxygène nécessaires à la survie et la croissance des cellules tumorales, ainsi que l'élimination du dioxyde de carbone et autres déchets résultant du catabolisme tumoral. Ce processus est régulé par un équilibre entre des facteurs pro- et antiangiogéniques. Lorsque la tumeur dépasse une taille critique, les cellules tumorales se retrouvent en hypoxie ce qui va induire l'activation du facteur de transcription HIF. Ceci a pour conséquence de stimuler la sécrétion de molécules pro-angiogéniques (VEGF ; *Platelet Derived Growth Factor*: PDGF, etc) et de rompre l'équilibre, entraînant dès lors le "*switch* angiogénique" à l'origine de l'angiogénèse ^{28,29}.

La néo-angiogénèse est un processus complexe qui comporte deux étapes : une **phase d'activation** aboutissant à la formation d'un nouveau vaisseau et une **phase de maturation** qui stabilise le vaisseau néo-formé.

Le VEGF est un facteur pro-angiogénique qui possède un rôle clé dans la formation et le développement de nouveaux vaisseaux ²⁸. La famille du VEGF rassemble plusieurs ligands : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF (*Placental Growth Factor*). Ces ligands possèdent une affinité plus ou moins importante pour les trois récepteurs au VEGF (VEGFR) : le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le VEGFR-3 ³⁰ (Figure 7). Ces récepteurs membranaires ont une

activité tyrosine kinase et ont un niveau d'expression variable selon les tissus. Les types 1 et 2 sont exprimés par les cellules endothéliales vasculaires et par diverses cellules hématopoïétiques (monocytes, macrophages et lymphocytes) et le VEGFR-3 principalement sur les cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont impliqués dans l'angiogenèse, le VEGFR-3 intervient dans la lymphangiogenèse, le tout contribuant à la croissance tumorale, l'invasion et la dissémination métastatique³⁰⁻³³.

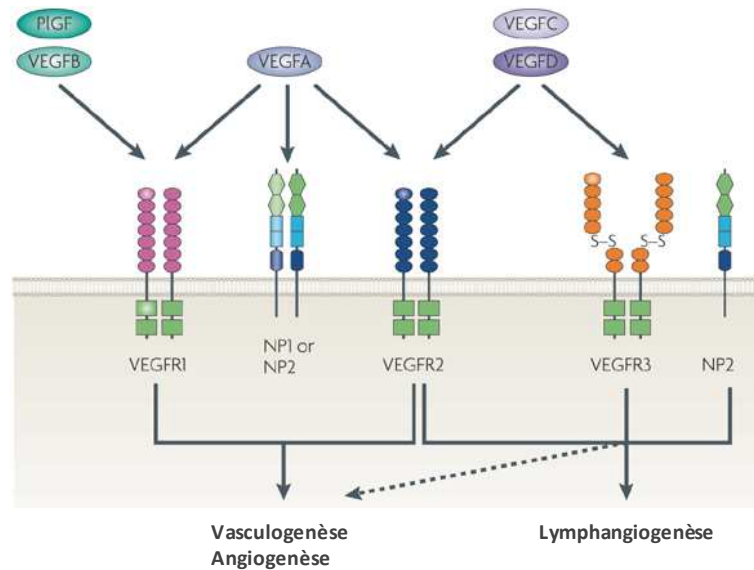


Figure 7 : Les récepteurs au VEGF et leurs ligands. Adapté d'après Lee M. Ellis & Daniel J. Hicklin³⁴.

PIGF : placenta growth factor ; *VEGF* : vascular endothelial growth factor ; *VEGFR* : vascular endothelial growth factor receptor

Le VEGF-A se lie spécifiquement aux récepteurs de type 1 et 2 avec une affinité beaucoup plus importante pour le VEGFR-1³¹. L'activation du VEGFR-2 est responsable d'une vasodilatation, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, et permet la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Les principales voies de signalisation impliquées dans cette régulation sont PI3K/Akt, p38 MAPK, PLC γ /PKC, Ras/MEK/ERK (Figure 8).

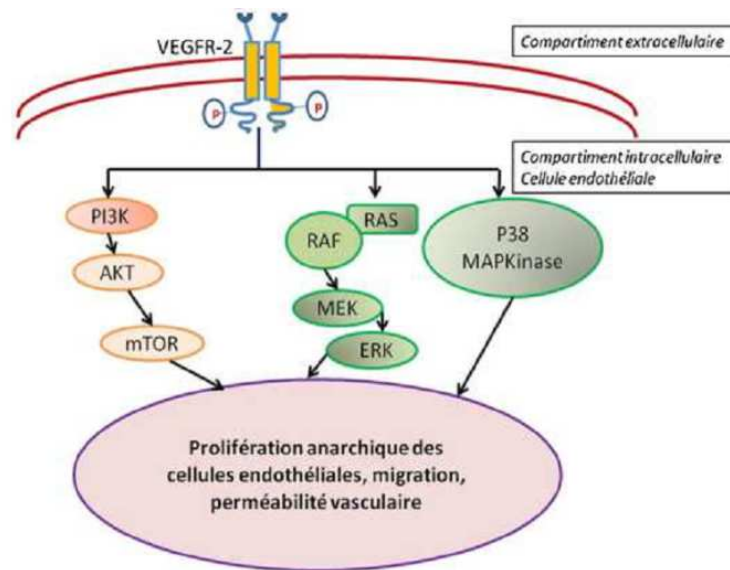


Figure 8 : Voies de signalisation du VEGFR. D'après Rivera S ³⁵.

ERK : extracellular signal-regulated kinases ; *MAPK* : Mitogen-activated protein kinases ; *MEK* : Mitogen-activated protein kinase kinase ; *mTOR* : mammalian target of rapamycin ; *p38* : p38 mitogen-activated protein kinases ; *PI3K* : phosphoinositide 3-kinase ; *VEGFR* : vascular endothelial growth factor receptor

Le PDGF joue également un rôle dans l'angiogenèse puisqu'il est impliqué dans la phase de maturation en favorisant le recrutement de cellules (péricytes et cellules musculaires lisses) qui vont aider à la stabilisation des nouveaux vaisseaux ³⁶.

1.6 Échappement au système immunitaire

Selon le concept de l'immunosurveillance, les cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître et de détruire les cellules malignes à l'origine des cancers. Les tumeurs qui se développent ont donc réussi à échapper au système de surveillance et éviter ainsi leur élimination par les cellules immunitaires ²⁰.

1.6.1 Immunosurveillance et immunoediting

1.6.1.1 Concept d'immunosurveillance

Dès le début du XXe siècle, le concept d'immunosurveillance a été évoqué. Il découle de différentes observations, dont celles de William Coley qui décrivent une association entre des rémissions de sarcomes et la survenue d'une surinfection à streptocoques responsable d'érysipèle

³⁷. L'hypothèse était que la réponse inflammatoire induite par l'infection pouvait également exercer un effet anti-tumoral.

Des arguments expérimentaux ont permis d'appuyer cette théorie, avec notamment l'utilisation de modèles de souris déficientes pour différents effecteurs de l'immunité qui ont plus de risques de développer des tumeurs spontanées ou induites ^{38,39}. Par ailleurs, il a été montré que les patients immunodéprimés ont un risque relatif de développement tumoral supérieur ⁴⁰. En effet, chez les patients ayant un déficit immunitaire primitif (syndrome de Wiskott Aldrich ⁴¹ ou trisomie 21 ⁴² par exemple) ou secondaire (traitement immunosuppresseur, syndrome de l'immunodéficience acquise ⁴³ par exemple) une augmentation de la fréquence de l'apparition de certaines tumeurs a été décrite. La découverte d'antigènes tumoraux est venue confirmer l'hypothèse de l'immunosurveillance. Ainsi, l'expression de ces antigènes associés aux tumeurs (TAA, en anglais *tumor-associated antigen*) permet au système immunitaire de distinguer les cellules tumorales de celles du « soi » ⁴⁴. Enfin, la présence d'infiltrats immunitaires dans le microenvironnement tumoral a été rapportée dans différents cancers. De nombreux types cellulaires y sont retrouvés : mastocytes, macrophages, les cellules dendritiques (DC) lymphocytes T (LT) incluant les LT helpers (Th1, Th2 et Th17), les lymphocytes T régulateurs (Treg), les LT cytotoxiques (CTL) CD8+ et les lymphocytes B. L'étude de la relation entre l'infiltrat tumoral et le pronostic clinique a permis de mettre en évidence qu'une présence importante de CTL ou de cellules Th1 était de bon pronostic ⁴⁵. Cette association constitue une preuve supplémentaire de l'immunosurveillance.

1.6.1.2 *Echappement immunitaire ou « immunoediting »*

Des tumeurs sont également susceptibles de se développer chez des individus immunocompétents, ce qui laisse supposer que l'échappement au système immunitaire est un processus essentiel permettant l'émergence de tumeurs (Hallmarks of K 2011). Ceci suggère que des modifications survenant au cours du développement tumoral permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à leur destruction. Il en découle le concept d'« *immunoediting* » ^{46,47} liant l'immunosurveillance à l'échappement tumoral selon 3 phases ⁴⁸ (Figure 9).

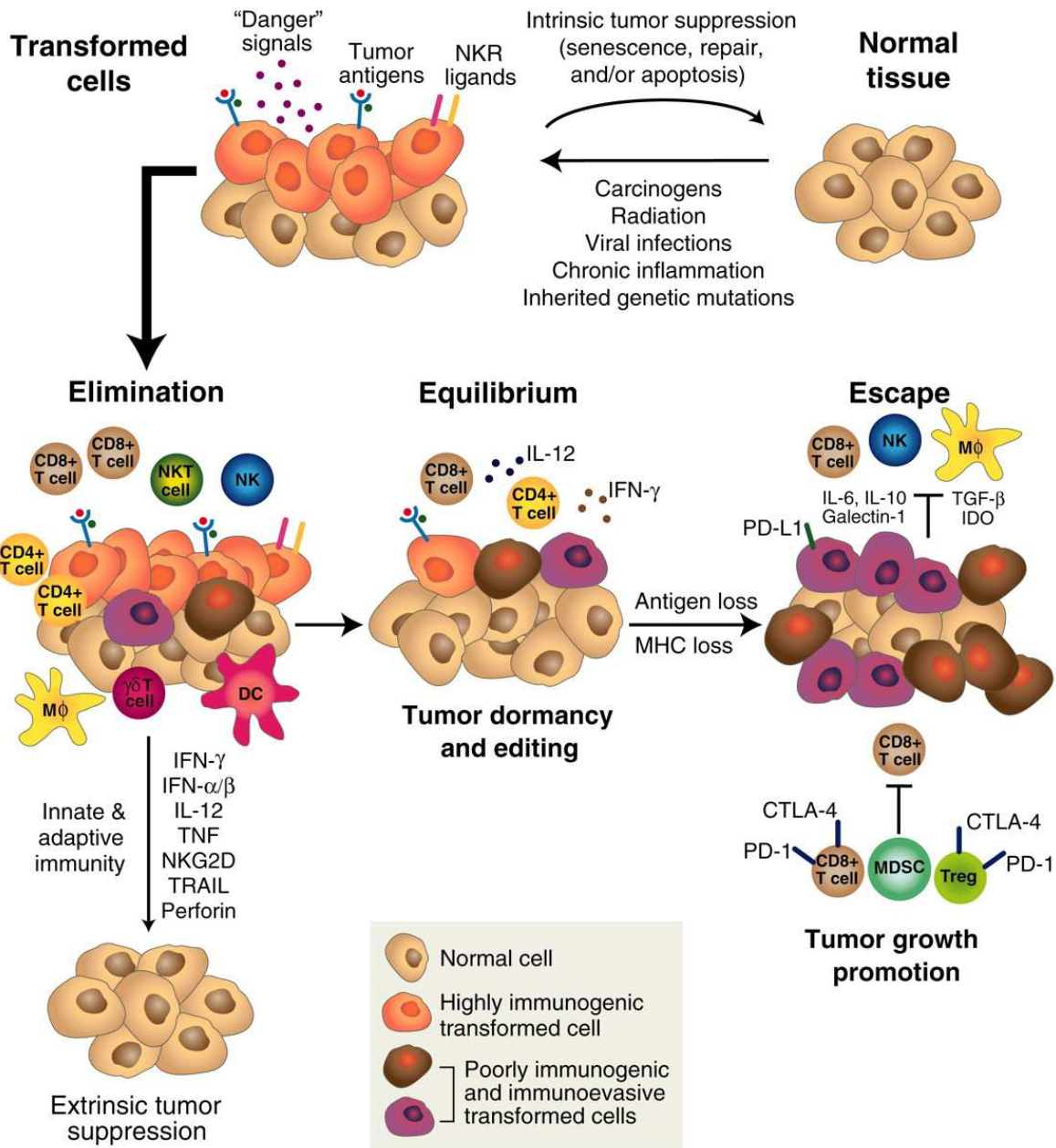


Figure 9 : Les 3 phases de l'immunoediting tumoral, d'après ⁴⁹

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4 ; *DC* : Dendritic Cells ; *IDO* : Indoleamine 2,3-DiOxygénase ; *IFN* : Interféron ; *IL* : Interleukine ; *MDSC* : Myeloid-derived suppressor cells ; *MHC* : Major Histocompatibility Complex, *MΦ* : *Macrophages* ; *NK* : Natural killer cells ; *PD-1* ; Programmed Death-1 ; *TGF* : Transforming Growth Factor ; *Treg* : *lymphocytes T régulateur*.

L'**élimination** est la phase retrouvée dans la théorie de l'immunosurveillance : les cellules en transformation sont reconnues et éliminées par le système immunitaire inné et adaptatif. La phase d'**équilibre** durant laquelle le système immunitaire, par pression de sélection positive, favorise l'émergence de variants de cellules tumorales capables d'éviter ou de résister à la réponse immunitaire. Ce long processus conduit à la phase d'**échappement**, où le système immunitaire ne peut plus contrôler la croissance de ces variants « immuno-résistants » et des lésions cancéreuses sont cliniquement détectables. Différents mécanismes permettent cet échappement ⁴⁶

: la perte d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ⁵⁰, la sécrétion de molécules immunosuppressives (*Transforming growth factor* TGF- β , interleukine (IL)-10, IL-6, indoleamine 2,3-DiOxygénase IDO) et le recrutement de cellules immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral (lymphocytes Treg ou Th17, *myeloid derived suppressor cell* MDSC) ⁵¹. Ces cellules immunosuppressives sont capables d'inhiber l'action cytotoxique des lymphocytes T ou d'avoir un effet pro-tumoral direct en produisant des facteurs de croissances tumoraux ou pro-angiogéniques. Enfin, la tumeur est capable d'induire une tolérance immunitaire en rendant les lymphocytes anergiques ou non fonctionnels, par le biais d'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices à leur surface (CTLA4 et PD1).

1.6.2 Points de contrôle et régulation du système immunitaire

1.6.2.1 La réponse immunitaire antitumorale

Chen *et al.* ont décrit la réponse immunitaire anti-tumorale sous le terme de « cycle cancer-immunité » ⁵². Elle se déroule en 7 étapes distinctes (Figure 10) :

- 1) Libération de néo-antigènes tumoraux suite à la mort de cellules tumorales.
- 2) Capture et dégradation de ces antigènes par des cellules dendritiques (DC), puis présentation par les molécules du CMH.
- 3) Migration des DC depuis les tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont l'amorcer (*priming*) et activer les LT naïfs en LT effecteurs CD8 en leur présentant l'antigène
- 4) Migration des LT CD8 vers la tumeur
- 5) Infiltration de la tumeur par les LT CD8
- 6) Reconnaissance des cellules tumorales *via* le complexe néo-antigène / CMH I présent à leur surface par le récepteur des lymphocytes (TCR).
- 7) Activation des LT effecteurs en LT cytotoxiques (CTL) capables de lyser la cellule tumorale.

Toutes ces étapes sont régulées par des co-récepteurs activateurs et inhibiteurs afin d'assurer un contrôle de la réponse immunitaire. Chacune de ces étapes est régulée par une balance entre molécules activatrices et inhibitrices, dont les points de contrôle immunitaire ou « *immune checkpoints* » font partie. Parmi les récepteurs inhibiteurs impliqués, sont retrouvés le *cytotoxic T lymphocyte antigen* (CTLA-4) et le *programmed cell death-1* (PD-1). Ainsi, le CTLA-4 empêche

l'activation des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes, tandis que PD-1 prévient l'activation lymphocytaire en périphérie et au niveau tumoral⁵³.

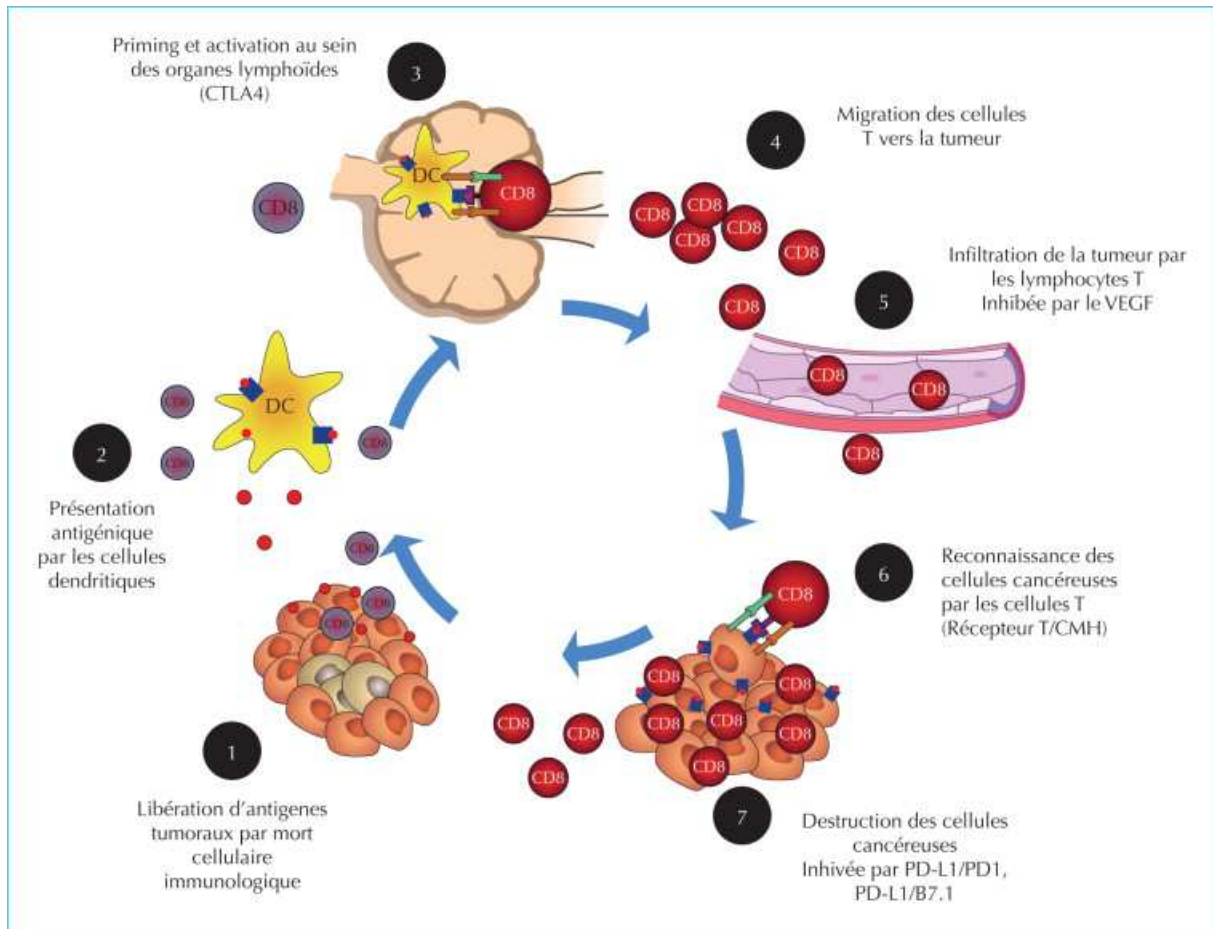


Figure 10 : Cycle cancer-immunité, d'après⁵²

CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen ; *PD-1* : programmed death-1 ; *PD-L1* : programmed death ligand-1

1.6.2.2 Le récepteur PD-1 et tolérance immunitaire

Le PD-1 est un récepteur transmembranaire exprimé sur un grand nombre de cellules immunitaires : lymphocytes T (CD4 et CD8) ainsi que les lymphocytes Treg, lymphocytes B, les monocytes activés, les DC et les cellules NK⁵⁴⁻⁵⁶. Les lymphocytes T naïfs périphériques expriment peu le PD-1 à leur surface. Son expression au niveau périphérique est normalement transitoire et peut être induite par l'activation des lymphocytes T, par la présence de cytokines (IL-2, IL-7) ou en cas d'exposition prolongée à un antigène. De manière physiologique, ceci permet de contrôler l'amplitude ainsi que la durée de la réponse immunitaire afin de limiter son retentissement sur les tissus sains, notamment lors d'infections^{55,57}. Les tumeurs détournent ces *immune checkpoints* pour échapper au système immunitaire.

Le PD-1 possède 2 ligands : PD-L1 (ou B7.H1 ou CD274) et PD-L2 (ou B7-DC ou CD273). Ces ligands appartiennent à la famille des protéines transmembranaires B7. PD-L1 est rarement

retrouvé dans les tissus sains mais exprimé sur de nombreuses cellules tumorales (dans 20 à 50 % des cancers ⁵⁸) et immunitaires pouvant être présentes au niveau du microenvironnement tumoral ou infiltrant la tumeur (TIL Lymphocytes infiltrant la tumeur) ^{59,60}. Le PD-L1 peut être induit par de nombreuses cytokines inflammatoires (TNF α , IFN γ , VEGF, IL-10) ou de façon innée grâce à l'activation de voies oncogéniques telles que la voie PI3K/Akt par délétion de PTEN ⁶¹. Sa forte expression est de mauvais pronostic dans plusieurs cancers.

L'expression de PD-L2 est plus restreinte. Ce dernier, retrouvé principalement sur les macrophages et les DC, interviendrait notamment dans la tolérance au niveau pulmonaire. Enfin, il est peu exprimé au niveau tumoral

L'interaction du PD-1 avec PD-L1 est responsable de la transduction d'un signal inhibiteur *via* les phosphatases SHP-1 ⁶² et SHP-2 (*Src homology domain containing tyrosine phosphatase*) ⁶³. Il en résulte un blocage de la cascade de PI3K/Akt en aval du TCR qui conduit à l'arrêt de mécanismes lymphocytaires tels que la migration, la prolifération ou l'activation de lymphocytes ^{64,65}. Il en résulte une anergie et une apoptose des LT ⁶⁶ (Figure 11).

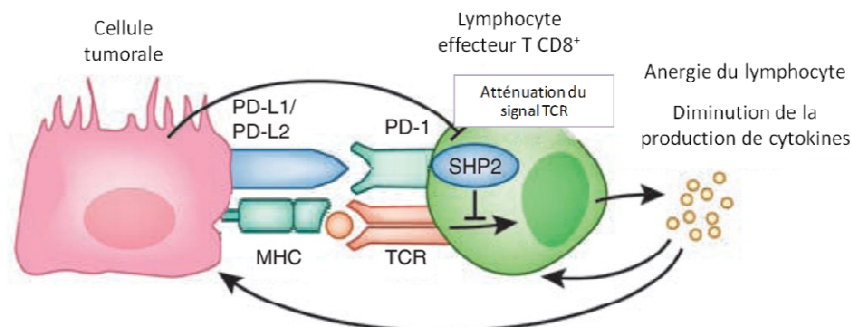


Figure 11 : Mécanisme d'action de l'axe PD-1 / PD-L1 dans la résistance immunitaire adaptative. Adapté depuis ⁶⁷.

MHC : *major histocompatibility complex*; PD-1 : *Programmed Death-1*; PD-L1/PD-L2 : *Programmed Death Ligand 1/2*; SHP2 : *Src homology domain containing tyrosine phosphatase 2*; TCR : *T cell receptor*

1.7 Stratégies thérapeutiques en oncologie

La compréhension des mécanismes d'oncogenèse a permis d'identifier des altérations moléculaires clés nécessaires au développement d'une tumeur, qui constituent autant de cibles potentielles pour la mise au point de molécules thérapeutiques. Ces thérapies dites « ciblées » sont donc dirigées contre des protéines impliquées dans le processus de transformation néoplasique d'une cellule. (Figure 12).

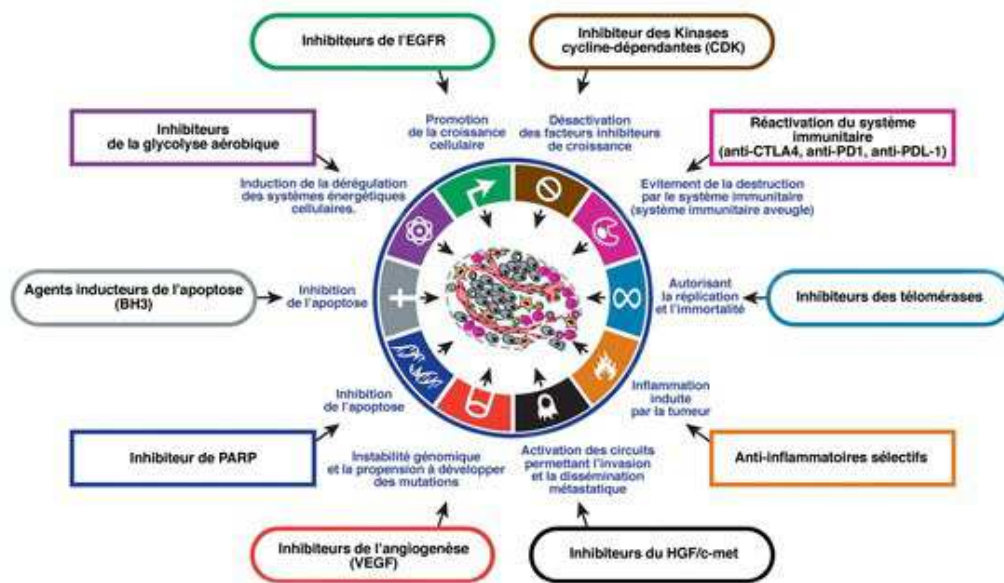


Figure 12 : Exemples de thérapies ciblées utilisées en cancérologie. D'après ²⁰.

BH3 : BCL-2 Homology 3; CDK : Cyclin-dependent kinases; CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4 ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; HGF : Hepatocyte growth factor; PARP : poly(ADP-ribose) polymerase ; PD-1 : Programmed Death-1 ; VEGF : vascular endothelial growth factor

1.7.1 Thérapies ciblant les protéines kinases

1.7.1.1 Addiction oncogénique

Weinstein et Joe ont introduit le concept d'**addiction oncogénique** selon lequel les cellules tumorales sont dépendantes des modifications apportées par des oncogènes pour pouvoir maintenir leur phénotype tumoral ⁶⁸. La mise en évidence de ce phénomène ainsi que la meilleure connaissance des voies moléculaires impliquées dans l'oncogénèse a permis le développement de **thérapies ciblées**, qui ont révolutionné la prise en charge de nombreux cancers.

1.7.1.2 Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des macromolécules de haut poids moléculaire. Ils inhibent de manière compétitive l'interaction ligand/récepteur par encombrement stérique en se fixant avec une grande spécificité au ligand ou au récepteur. Leur action est donc uniquement extracellulaire et ils présentent un intérêt majeur en cas de surexpression du ligand ou du récepteur sauvage. Pour exemple, le bevacizumab (Avastin[®]) qui cible le VEGF est indiqué en monothérapie dans le traitement du cancer métastatique du colon ou du rectum, en association dans le traitement du cancer du sein métastatique, du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), du cancer du

rein avancé et/ou métastatique et du cancer épithélial de l'ovaire. Le ramucirumab (Cyramza[®]) est aussi un anticorps monoclonal anti-VEGF qui est utilisé dans le cancer gastrique ou de la jonction œsogastrique. Le trastuzumab (Herceptin[®]) qui cible les tumeurs surexprimant le récepteur HER2 est utilisé dans certains cancers du sein (métastatique ou précoce) et du cancer gastrique métastatique ⁶⁹. Le cetuximab (Erbix[®]) et le panitumumab (Vectibix[®]), deux anti-EGFR, sont indiqués en l'absence de mutation de Ras dans le cancer colorectal. Les principaux inconvénients des anticorps monoclonaux sont liés à l'immunogénicité qu'ils peuvent induire et à leur modalité d'administration par voie injectable.

1.7.1.3 *Les inhibiteurs de protéines à activité kinase*

Les inhibiteurs de protéines kinase, telles que le sunitinib, le sorafenib ou le pazopanib, sont de petites molécules capables de franchir facilement la membrane cytoplasmique. Au niveau du site actif des kinases ils se fixent dans la poche à ATP entrant ainsi en compétition avec l'ATP nécessaire à la réaction de phosphorylation. Ils inhibent de cette manière l'activation de la protéine kinase et par conséquent la transduction du signal intracellulaire qui en découle.

Malgré leur dénomination de « thérapies ciblées », ces mimétiques de l'ATP sont relativement peu spécifiques en raison de la similarité de structure des sites catalytiques des diverses kinases ⁷, directement lié à la filiation phylogénétique des kinases ⁷. Ils agissent donc sur différentes kinases avec une affinité plus ou moins forte, définissant un spectre d'activité propre à chaque inhibiteur ⁷⁰ (Figure 13). Ce manque de spécificité présente l'avantage de pouvoir les utiliser en monothérapie mais l'inconvénient d'être responsable de nombreuses toxicités. La sévérité des effets secondaires reste tout de même moindre que celle induite par les chimiothérapies classiques.

L'imatinib (Glivec[®]) est le pionnier des inhibiteurs de kinases en ciblant la protéine TK Bcr-Abl dans les leucémies myéloïdes chroniques.

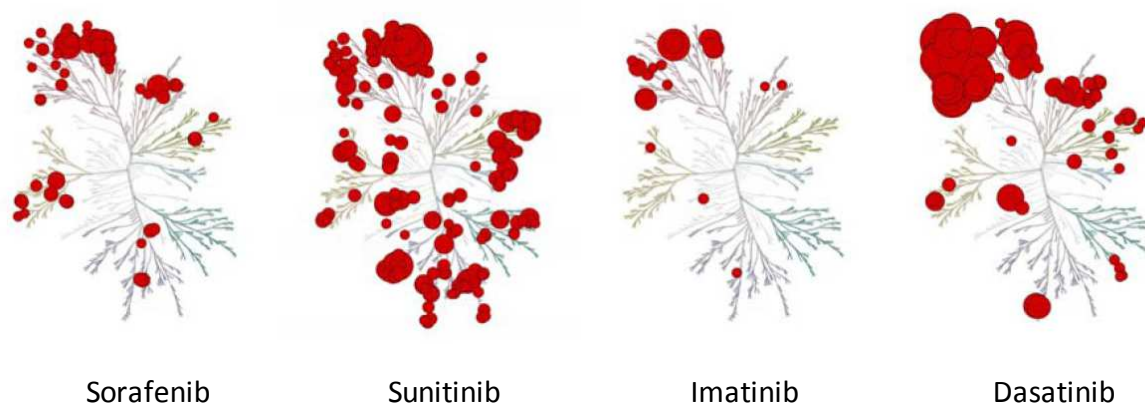


Figure 13 : Profils d'affinité de différents inhibiteurs de tyrosine kinases pour le kinome, d'après ⁷⁰.
 Le diamètre des cercles rouges est indirectement corrélé à l'affinité avec laquelle l'inhibiteur de tyrosine kinase se lie à la protéine kinase ; le cluster dans la partie en haut à gauche correspond à la famille des tyrosines kinases.

1.7.2 Les immunothérapies

Les progrès de la connaissance des mécanismes de l'immunité antitumorale ont permis de développer différentes stratégies d'immunothérapie. Il existe ainsi des immunothérapies passives et actives.

❖ Immunothérapies passives

Ces thérapies reposent sur l'apport d'effecteurs cytotoxiques *via* l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux, comme le rituximab (Mabthera[®]) qui est un anti-CD20 utilisé dans les lymphomes non-Hodgkiniens. L'immunothérapie adoptive consiste à administrer directement des cellules immunitaires au patient, telles que des LT, des NK, des CARs (*Chimeric Antigen Receptor*) qui sont les LT avec un récepteur antigénique chimérique.

❖ Immunothérapies actives

L'immunothérapie active consiste à induire une réponse immunitaire chez le patient. Pour ce, les vaccins anti-tumoraux sont constitués de peptides dérivés d'antigènes tumoraux liés à des cellules présentatrices d'antigènes ou des exosomes. L'objectif de cette vaccination est d'induire une réponse lymphocytaire spécifique de la tumeur, avec la potentielle mise en place d'une mémoire immunologique. Cependant ces vaccins thérapeutiques sont encore du domaine de la recherche, nécessitent de disposer d'antigènes spécifiques de tumeurs et requièrent souvent une technologie complexe pour individualiser le traitement. Par ailleurs, les anticorps monoclonaux inhibiteurs des *immune checkpoints* ont permis de grandes avancées dans la prise en charge de certains cancers tels que le mélanome et le carcinome urothélial, en rétablissant les capacités fonctionnelles des LT

anergiques. Différents anticorps monoclonaux sont actuellement commercialisés : les inhibiteurs du CTLA-4 avec l'ipilimumab (Yervoy[®]), les inhibiteurs du PD-1 tels que le nivolumab (Opdivo[®]) et le pembrolizumab (Keytruda[®]) ou de son ligand PD-L1 avec l'atezolizumab (Tecentriq[®]).

1.7.3 Problématiques des thérapies ciblées

Les inhibiteurs de kinases ainsi que plus récemment l'immunothérapie ont fait preuve d'une grande efficacité clinique, révolutionnant la prise en charge thérapeutique de certains cancers. La qualité de vie des patients a été considérablement améliorée par l'utilisation de ces thérapies. En effet, les inhibiteurs de kinases s'administrent quotidiennement par voie orale, permettant un traitement ambulatoire. Par ailleurs, l'administration d'immunothérapie est réalisée toutes les 2 ou 3 semaines en hôpital de jour. Ces thérapies agissent de façon spécifique sur des cibles moléculaires et présentent par conséquent moins d'effets indésirables que les chimiothérapies conventionnelles.

Bien que réduites, ces toxicités ne sont pas négligeables et peuvent être responsables d'une diminution voire d'un arrêt transitoire ou définitif du traitement. Par ailleurs, des décès liés à ces toxicités ont déjà été rapportés avec les immunothérapies. Enfin, des phénomènes de résistances primaires ou secondaires au traitement ont été observés chez certains patients.

Les toxicités ainsi que les résistances, associées au coût très élevé de ces thérapies ciblées, soulèvent la question de la sélection des patients les plus à même de bénéficier de ces traitements. Dans ce contexte, l'identification de biomarqueurs pourrait aider à l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des patients traités par thérapies ciblées.

2 Identification de biomarqueurs et approche kinomique

2.1 Généralités sur les biomarqueurs

Selon la définition proposée par le *National Institute of Health* (NIH), un biomarqueur est "une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique" ⁷¹. Cette mesure doit être effectuée par des techniques robustes et reproductibles. Les domaines d'application des biomarqueurs sont multiples. Ils peuvent concerner les phases de recherche et de développement d'un médicament ou encore l'utilisation en pratique courante clinique.

Il existe différents types de biomarqueurs ⁷² :

- physiopathologiques qui expliquent les modifications des fonctions de l'organisme
- diagnostiques qui identifient une pathologie
- pronostiques qui déterminent la probabilité d'évolution de la maladie
- prédictifs qui déterminent la probabilité de réponse à un traitement donné
- pharmacodynamiques qui reflètent l'effet d'un traitement sur les cellules

Tableau 1 : Définition des biomarqueurs selon le *National Institute of Health (NIH)*, d'après ^{71,73}.

Dénomination	Définition
Biomarqueur	Caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit d'un processus biologique normal ou pathologique, soit de réponse pharmacologique résultant d'une intervention thérapeutique
Biomarqueur de type 0	Marqueur biologique de la progression de la maladie relié à un paramètre clinique connu
Biomarqueur de type I	Marqueur biologique qui reflète les effets d'une thérapeutique selon son mécanisme d'action
Biomarqueur de type II	Marqueur biologique considéré comme un critère de substitution : une modification de ce biomarqueur est associée à un bénéfice clinique ou à un risque
Critère de substitution [ou « Surrogate endpoint »]	Catégorie de marqueurs destinés à se substituer à un critère d'évaluation clinique devant permettre de déterminer le bénéfice clinique ou le risque à partir de données épidémiologiques, thérapeutiques ou physiopathologiques
Critère d'évaluation clinique [ou « Clinical end point »]	Caractéristique ou variable qui reflète l'état du patient.
Marqueur pronostique	Marqueur permettant de différencier des catégories de patients à différents risques pour une évolution déterminée, indépendamment du choix du traitement administré (ou du choix de ne pas administrer de traitement)
Marqueur prédictif	Marqueur permettant de prévoir les éventuels bénéfices (efficacité) et risques (toxicité) d'un traitement selon le statut du marqueur.

En pratique clinique, un biomarqueur peut être utilisé pour le diagnostic, l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament, ou encore la progression de la maladie. Il peut être indirect : un ou plusieurs paramètres biologiques (caractéristique génétique, protéines, métabolites) peuvent caractériser un état physiologique ou pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement.

2.2 Biomarqueurs en cancérologie

Avec l'émergence des thérapies ciblées, l'identification de nouveaux biomarqueurs est devenue une priorité en cancérologie. Dans le cadre d'un objectif de médecine personnalisée, il est

essentiel d'adapter les traitements des patients en fonction de leurs caractéristiques individuelles⁷⁴. Pour ce faire, l'identification de facteurs prédictifs est déterminante.

2.2.1 Nécessité de biomarqueurs

Les biomarqueurs permettraient de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces thérapies, ainsi que d'en optimiser la dose et le rythme d'administration. Ils pourraient également aider à l'identification des patients d'emblée résistants ou présentant un risque d'échappement thérapeutique, ainsi que ceux susceptibles de développer des toxicités. L'identification de marqueurs précoces de réponse au traitement serait également très utile pour la proposition d'alternative thérapeutique en cas d'échec. Enfin, de tels marqueurs permettraient de diminuer le coût de ces thérapies en choisissant initialement le bon traitement pour le bon patient et à la bonne posologie. Dans ce contexte, de nombreuses équipes cherchent à identifier des biomarqueurs pharmacodynamiques, prédictifs, pronostics ou encore des *surrogate* biomarqueurs⁷⁵. Cette recherche peut être menée au sein de la tumeur ou dans les fluides biologiques, du diagnostic de la maladie jusqu'à la progression de cette dernière^{76,77}.

Certains biomarqueurs sont utilisés en test compagnon en pratique quotidienne par les cliniciens pour le choix du traitement. Par définition, un test compagnon est un test diagnostique permettant de sélectionner, en fonction de leur statut pour un marqueur prédictif identifié par ce test, uniquement les patients chez lesquels le traitement est susceptible d'apporter un bénéfice parmi ceux diagnostiqués pour une maladie donnée⁷⁸. Le test est donc « compagnon » d'utilisation de l'administration du traitement. A ce jour, différents tests compagnon permettent de sélectionner les patients susceptibles de recevoir un bénéfice d'une thérapie ciblée. Pour exemple, seuls les patients présentant un cancer du sein ou gastrique surexprimant HER2+ bénéficient d'un traitement par trastuzumab (Herceptin[®]). De la même manière, les patients atteints d'un cancer du poumon avec une mutation activatrice de l'EGFR sont éligibles au traitement par inhibiteurs de l'EGFR tels que l'erlotinib (Tarceva[®]), le gefitinib (Iressa[®]) ou l'afatinib (Giotrif[®]). Les patients présentant une tumeur ayant la mutation BRAF (mélanome, thyroïde) sont traités par inhibiteur de BRAF tels que le vemurafenib (Zelboraf[®]) ou le dabrafenib (Tafinlar[®]). Enfin, l'utilisation du cetuximab (Erbitux[®]) est indiquée chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique ayant un statut RAS non muté (KRAS et NRAS). Des plateformes de génétique moléculaire des cancers ont été créées afin de réaliser ces tests moléculaires innovants. En France, en 2015, 76200 patients ont bénéficié *via* ces plateformes d'un test

génétiq ue moléculaire déterminant l'accès à une thérapie ciblée ⁷⁹. Ces marqueurs prédictifs sont donc pour la majorité des marqueurs tissulaires détectés au niveau de la tumeur. L'osimertinib (Tagrisso[®]) a été commercialisé récemment dans le traitement des cancers du poumon présentant la mutation EGFR T790M, qui est une mutation de résistance aux inhibiteurs de première et deuxième génération de l'EGFR. Ainsi les patients qui progressent après un traitement par inhibiteur de l'EGFR de première génération doivent avoir une nouvelle biopsie pour cette analyse. A l'heure actuelle quand cette biopsie n'est pas réalisable, la possibilité de rechercher cette mutation sur une biopsie liquide ⁸⁰ a été validée et permet de justifier un traitement par osimertinib. Ainsi l'utilisation de biomarqueurs circulants prédictifs de la réponse à une thérapie ciblée est en train d'émerger ⁸¹.

Cependant, pour les thérapies antiangiogéniques et les immunothérapies, aucun biomarqueur n'a été validé à ce jour, malgré de nombreux travaux de recherche sur le sujet.

2.2.2 Biomarqueurs de l'angiogenèse

De nombreux paramètres ont été étudiés afin de définir un biomarqueur prédictif, pronostique ou pharmacodynamique chez les patients traités par antiangiogéniques ⁸².

Les divers biomarqueurs explorés incluent la mesure de la pression artérielle, la quantification plasmatique de marqueurs circulants tels que le VEGF, le PlGF ou le VEGFR solubles, ou encore les cellules endothéliales circulantes ou leur précurseurs dérivées de la moelle osseuse. La mesure de marqueurs tissulaires avec l'expression du VEGF ou du VEGFR2 a également été testée. Les progrès de l'imagerie ont permis dernièrement de pouvoir estimer la densité des micro-vaisseaux ⁸³ ou encore la constante K^{trans} mesurée par imagerie par résonance magnétique (constante de transfert de volume de gadolinium depuis le plasma jusqu'au compartiment extravasculaire et extracellulaire) qui reflète en partie la perméabilité, le flux vasculaire et bien l'architecture vasculaire ⁸⁴⁻⁸⁶. Enfin, les analyses génotypiques avec l'étude du polymorphisme du VEGF ou de l'interleukine IL-8 ainsi que les miRNA se sont avérées être des pistes intéressantes.

Une fois les biomarqueurs identifiés, l'enjeu est de démontrer par la suite leur caractère prédictif. Ceci équivaut à définir son aptitude à améliorer le devenir clinique des patients en aidant à la prise de décision thérapeutique. Cependant, à ce jour, aucun biomarqueur prédictif, pharmacodynamique ou pronostique de thérapies antiangiogéniques n'a pu être cliniquement validé.

2.2.3 Biomarqueurs et immunothérapies

La recherche de biomarqueurs pour les immunothérapies ciblant la voie du PD-1/PD-L1 est nécessaire pour prédire la réponse à ces thérapies. Par ailleurs, elle est aussi primordiale pour l'élucidation des mécanismes impliqués dans cette voie et le développement de stratégies thérapeutiques combinées.

A ce jour, l'expression du ligand PD-L1 sur les cellules tumorales ou immunitaires est le marqueur le plus étudié. De nombreux essais cliniques utilisant des agents ciblant le PD-1 ou le PD-L1 dans divers cancers ont montré que les tumeurs PD-L1 positives (PD-L1 +) présentaient un meilleur taux de réponse aux inhibiteurs de la voie du PD-1/PD-L1 ⁸⁷. Cependant, une proportion non négligeable de cancers ayant un statut immunohistochimique PD-L1 négatif (PD-L1 -) répond tout de même au traitement, ce qui suggère que d'autres ligands du PD-1 tels que le PD-L2 pourraient être intéressants à explorer afin d'identifier les futurs répondeurs ou non au traitement. Ainsi, il a été récemment montré que des types tumoraux pouvaient exprimer seulement chez certains patients du PD-L2, ce qui pourrait expliquer leur réponse clinique aux inhibiteurs de la voie du PD-1/PD-L1 tout en présentant un statut PD-L1 ⁸⁸. Ces résultats montrent que l'expression seule du ligand PD-L1 ne peut à ce jour être utilisée comme test compagnon pour sélectionner les patients qui pourraient bénéficier des inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1. Par ailleurs, il est important de souligner que le statut PD-L1 souffre actuellement d'un manque de standardisation technique, en terme de cellules à étudier ou de méthode pour le marquage par immunohistochimie (IHC), ainsi que de l'absence de référence concernant le seuil de positivité du ligand PD-L1 à utiliser ⁸⁷. Au final, tous ces différents éléments sont clairement des facteurs limitant à la validation clinique de l'expression du ligand PD-L1 comme test compagnon pour les inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1.

Plusieurs marqueurs du microenvironnement tumoral ont également été étudiés. Ainsi, de récents travaux ont montré que le taux d'expression de PD-L1 est associé à la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) ^{89,90}. Chez des patients atteints de mélanome traité par pembrolizumab, une association a été décrite entre le taux de lymphocytes T CD8 intra-tumoraux et le taux de réponse. L'étude de la Phase II de l'atezolizumab dans le traitement du cancer urothélial a récemment rapporté la même association ⁹⁰.

Chez des patients atteints de mélanome ou CBNPC et traités par MPDL3280A (anticorps dirigé contre le PD-L1), Herbst *et al.* ont rapporté qu'une forte expression en *baseline* du gène de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et du CTLA-4 était corrélée à une meilleure réponse clinique ⁹¹. Chez les patients atteints de mélanome, les patients répondeurs au MPDL3280A présentaient un taux élevé d'IFN circulant ⁹¹ et un taux important de gènes liés à l'IFN ⁹².

Le statut IHC du PD-L2 a aussi montré des résultats intéressants dans le cancer pulmonaire traité par pembrolizumab ⁸⁸.

Enfin, la surexpression au niveau des LT CD8 circulants de Bim (*Bcl2 interacting mediator of cell death*), protéine impliquée dans l'apoptose des LT, est prédictive de la réponse aux inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 chez patients atteints d'un mélanome métastatique ⁹³.

D'autres travaux se sont focalisés sur les mutations somatiques. Ainsi, une association entre l'expression de PD-L1 et le taux de mutations génétiques a été mise en évidence ⁹⁴. De plus, une association entre la charge mutationnelle et la réponse aux immunothérapies a été décrite, notamment au cours des essais menés dans le CBNPC traité par pembrolizumab ⁹⁵ et les carcinomes urothéliaux traités par atezolizumab ⁹⁰. De la même façon, une association entre taux de mutations somatiques (liée à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (« *mismatch-repair* ») et réponse, a été décrite chez des patients atteints de cancer colorectal ⁹⁶. Au travers de plusieurs essais, une corrélation entre la charge mutationnelle et le bénéfice des immunothérapies a pu être démontrée parmi les différents types tumoraux ⁹⁷.

2.3 Intérêt de la kinomique

Les progrès des nouvelles technologies ont permis l'émergence de stratégies pour la découverte de biomarqueurs dans le cancer. Les techniques à haut débit utilisées en génomique, transcriptomique, protéomique ou encore en métabolomique permettent d'étudier des centaines de gènes, protéines ou métabolites contenus dans des matrices biologiques tels que les tissus ou les liquides biologiques. Les approches « traditionnelles » qui permettaient jusque là d'identifier un gène ou une protéine « candidat » sont désormais concurrencées par ces nouvelles approches qui déterminent des « signatures », utiles pour le diagnostic et la classification de tumeurs aussi bien que pour prédire la réponse à un traitement donné ^{98,99}.

Comme précédemment évoqué, les kinases jouent un rôle primordial dans la régulation et la transmission des signaux intra-cellulaires. D'ailleurs, leur dérégulation a été clairement démontrée

comme étant impliquée dans diverses pathologies dont le cancer ¹⁰⁰ et les mutations au sein des domaines à activité kinase sont fréquemment associés à la tumorigenèse ²¹. Différentes approches sont actuellement disponibles pour étudier leurs caractéristiques (Figure 14). L'approche génomique permet de savoir si un gène est muté. Cependant, cette technique ne permet pas toujours de prédire la fonctionnalité ou non de la protéine kinase dérivée. Il en est de même concernant la protéomique qui mesure l'expression d'une kinase sans en déterminer sa fonctionnalité ¹⁰¹. En effet, des événements transcriptionnels ou post-transcriptionnels (gène silencieux, ARNm stable, séquestration d'enzymes loin de leur substrat, etc) peuvent être responsables d'une modulation de l'activité des protéines kinases, ce qui n'est pas identifiable avec la protéomique ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Le terme de kinomique a été employé pour la première fois en 2005 par Johnson et Hunter ¹⁰⁵. L'approche kinomique s'intéresse directement à la **fonctionnalité des kinases**, en étudiant leur activité de phosphorylation ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. En effet, l'expression d'une protéine peut correspondre à une forme fonctionnelle ou non-fonctionnelle et n'a pas toujours un retentissement en terme d'activité dans la cellule. Le profil kinomique d'une cellule consiste donc à déterminer l'activité enzymatique de l'ensemble des kinases et reflète donc le **phénotype cellulaire** ¹⁰⁹.

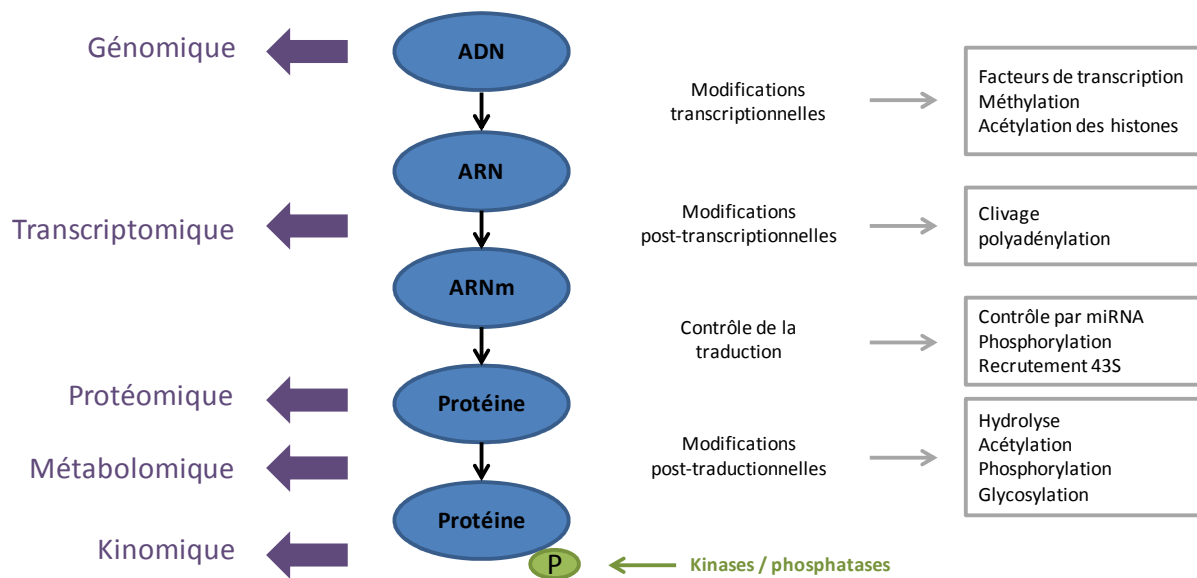


Figure 14 : Facteurs impliqués dans l'activité des kinases et techniques « omiques » (non exhaustif) utilisées pour la caractérisation des protéines kinases, adapté depuis ¹¹⁰.

La protéine kinase peut subir des modifications à 4 niveaux: modifications transcriptionnelles, post-transcriptionnelles, contrôle de la traduction, modifications post-traductionnelles.

Dans ce contexte, l'analyse du kinome pourrait permettre d'affiner notre compréhension des mécanismes cellulaires en jeu lors d'un traitement antitumoral et représente une source prometteuse de biomarqueurs dans le cancer ^{7,107}.

2.3.1 Généralités sur l'approche kinomique

Depuis les années 2000, une étude approfondie de la phosphorylation des protéines a été menée afin d'analyser la signalisation cellulaire. Dans ce but, deux approches complémentaires ont été utilisées : la phosphoprotéomique et la kinomique (Figure 15). Alors que la phosphoprotéomique consiste à étudier simplement les protéines phosphorylées (donc les substrats des kinases), la kinomique s'intéresse à la fonctionnalité des kinases. Bien que ces approches soient fortement liées, puisqu'elles traduisent un même phénomène, les techniques permettant de les étudier sont bien différentes. La spectrométrie de masse est aujourd'hui la technique la plus utilisée en phosphoprotéomique ¹¹¹. Cependant l'analyse du phosphoprotéome est plus délicate d'un point de vue expérimental. En effet, le nombre d'éléments constituant le phosphoprotéome est relativement faible puisque seulement 1 à 2 % de phosphoprotéines sur l'ensemble des protéines d'une cellule sont retrouvés. Deux facteurs peuvent expliquer ce résultat : la nature dynamique du phénomène de phosphorylation (rapide et transitoire) et la taille du protéome qui supplante la faible quantité de phosphoprotéines, rendant ainsi leur détection difficile ¹¹²⁻¹¹⁵. Cette faible sensibilité de la phosphoprotéomique peut représenter un facteur limitant à son utilisation, particulièrement pour la détection de phosphoprotéines faiblement exprimées au sein de la cellule.

Concernant l'approche kinomique, différentes techniques peuvent être employées afin de mesurer l'activité des protéines kinases. Cependant, seule la technologie par *microarray* sera développée dans ce manuscrit.

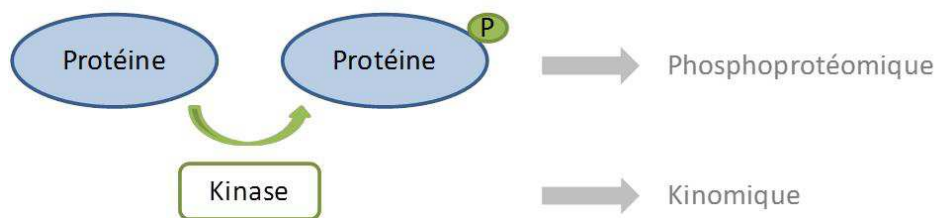


Figure 15 : Principes de la phosphoprotéomique et de la kinomique, d'après ¹¹⁰

2.3.1.1 Principe de l'approche kinomique par peptide array

Le principal obstacle concernant l'analyse globale du kinome est la nature des substrats employés. Bien que les protéines soient les substrats biologiques des kinases, leur synthèse à grande échelle est difficile et elles sont instables sur des *arrays*. Une alternative a donc été d'utiliser des peptides qui représentent des séquences comprenant un site de phosphorylation (arsenault 2011).

La synthèse des peptides est compatible avec les technologies à *microarrays*¹¹⁶. Ces *arrays* sont donc composés de centaines voire de milliers de peptides synthétisés et immobilisés sur une membrane¹¹⁷, permettant d'évaluer ainsi à partir d'un seul test le profil phénotypique d'une cellule en déterminant l'activité de centaines de kinases (profil kinomique).

Lorsqu'un échantillon contenant des kinases actives est appliqué sur l'*array* en présence d'ATP, ces dernières vont phosphoryler leurs peptides cibles. La quantification de la phosphorylation de ces peptides, permet de déduire l'activité des kinases cellulaires. Elle peut se faire de différentes manières incluant, entre autres l'utilisation d'anticorps spécifiques du résidu phosphorylé, d'ATP radiomarqué ou de coloration des sites phosphorylés¹⁰⁷. Une fois les peptides identifiés, la difficulté réside dans l'identification des kinases actives. En effet, généralement, un peptide est substrat de différentes kinases, ce qui oblige l'utilisation de logiciels de déconvolution permettant, par des méthodes statistiques, l'identification des kinases impliquées. Il est également possible de remonter ainsi à des voies de signalisation.

2.3.1.2 La technologie PamGene[®]

Différentes compagnies ont développé des techniques *microarray* pour l'analyse kinomique (Tableau 2). Ces *microarrays* peuvent contenir des dizaines à des milliers de peptides qui sont substrats de kinases et qui présentent un ou plusieurs sites de phosphorylation^{107,118}. Concernant les techniques de quantification de la phosphorylation, plusieurs approches sont disponibles telles que la fluorescence et l'utilisation de radio-isotopes qui reposent sur l'incorporation de cet isotope à la cible¹⁰⁷. L'incorporation d'isotope est cependant lente, rendant cette technique peu sensible.

Tableau 2 : Différentes techniques peptides *arrays* commercialisés, d'après ¹⁰⁷

Nom	Technologie	Compagnie	Nombre de substrats	Méthode de visualisation
PepScan	« Peptide array » en spots	PepScan Therapeutics	10 000-100 000	Variable
PepStar	« Peptide array » en spots sur mesure	JPT	100-1000	Variable
PamChip	Peptides immobilisés sur une surface poreuse	Pamgene	50-150	Fluorescence
Peptide array CellulSpots	« Peptide array » en 96 puits «Peptide array» sur une membrane cellulose	ChemPep Intavis AG	96 1-384	Radiomarquage Variable
Reverse-phase protéine array RPPA	«Peptide array» sur sample blotting	Theranostics Health	100s	Fluorescence

La plupart des technologies par *microarrays* utilise une surface à deux dimensions pour l'immobilisation des peptides. La technologie PamGene[®] utilise une membrane poreuse en oxyde d'aluminium en trois dimensions (3D) ¹¹⁹, sur laquelle les peptides-substrats purifiés sont immobilisés de façon covalente. La nature unique de ces *arrays* provient de cette membrane contenant des canaux (ou pores) (Figure 16B) qui permet d'augmenter jusqu'à 500 fois la surface, ce qui résulte en la fixation d'un très grand nombre de peptides et par conséquent en une très grande sensibilité de la technologie. De plus, l'échantillon est pompé activement de haut en bas à travers ces pores (Figure 16C), permettant ainsi de s'affranchir du phénomène de diffusion de l'échantillon à travers la membrane habituellement observé. Ceci diminue par conséquent le temps de réaction tout en augmentant la sensibilité par rapport aux autres systèmes connus. La phosphorylation des peptides est détectée en utilisant d'un anticorps spécifique de la phosphorylation directement marqué par un fluorochrome pour les tyrosines phosphorylées ou révélée par un anticorps secondaire fluorescent pour les sérines/thréonines phosphorylées. La quantification s'effectue ensuite à l'aide d'une caméra CCD (*charged-couple device*) (Figure 17).

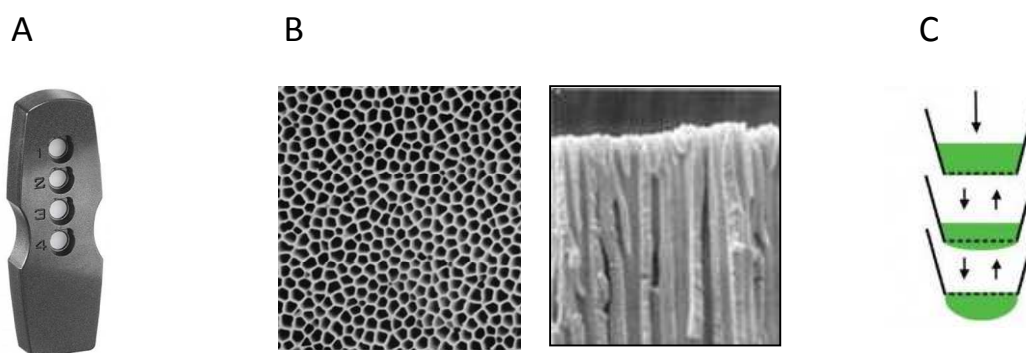


Figure 16 : A. Puce à *microarray* de la société PamGene. B. Membrane poreuse d'un *array*, vue de dessus (à gauche) et vue en coupe transversale (à droite) ¹²⁰. C. L'échantillon est pompé activement de haut en bas à travers la membrane poreuse.

Enfin, le suivi en temps réel de la phosphorylation représente également un autre intérêt de cette technologie. Ainsi, à chaque fois que l'échantillon est pompé à travers la membrane, la fluorescence est mesurée, l'intensité de phosphorylation augmentant à chaque cycle. Au final, ce suivi permet de caractériser les cinétiques de phosphorylation de chacun des peptides.

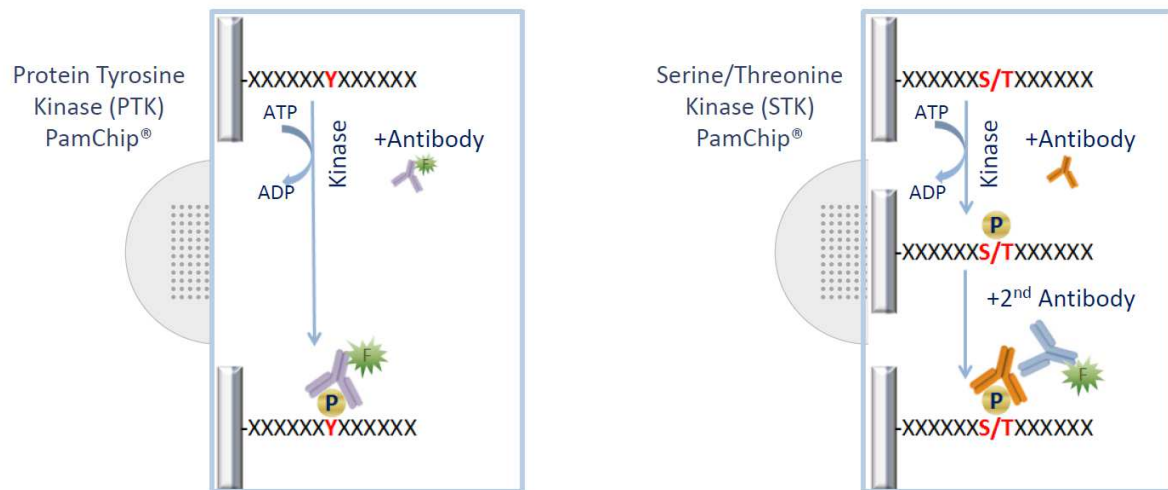


Figure 17 : Principes de détection de la phosphorylation des peptides sur les puces à *microarrays* PamChip® l'aide d'anticorps marqués par un fluorochrome.

A gauche : détection de l'activité de protéines tyrosine kinases (PTK), à droite : détection de l'activité de protéines sérine/ thréonine kinases (STK). Y : résidu tyrosine ; S/T : résidus sérine/ thréonine

2.3.2 Approche kinomique en cancérologie fondamentale

L'approche kinomique peut être utilisée pour différents objectifs. Elle peut être utile pour identifier des substrats de nouvelles kinases, de kinases mutées ou modifiées post-traductionnellement. Ainsi, elle a permis de caractériser les propriétés fonctionnelles de la tyrosine kinase JAK2 mutée (V617F) impliquée dans les syndromes myéloprolifératifs^{121,122} et de distinguer les différences intrinsèques entre les propriétés catalytiques des protéines de fusion NUP214-ABL1 et BCR-ABL1 qui jouent un rôle dans la survenue de leucémies lymphoblastiques aiguës T¹²³. L'approche kinomique permet aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques à partir de lignées cellulaires, de modèles murins de xénogreffes et de tissus humains. Ainsi, Kuijer *et al.* ont montré à partir de lignées cellulaires que l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTORC1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des ostéosarcomes¹²⁴. De même, il a été rapporté à partir de 67 biopsies tumorales de patients atteints d'un cancer du rectum avancé, qu'une activité accrue de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) était associée à une maladie plus agressive caractérisée par une survie sans progression plus courte¹²⁵. Ces résultats suggèrent que cibler la voie de signalisation PI3K pourrait être une

nouvelle option thérapeutique dans le traitement du cancer rectal avancé. Enfin, Maat *et al.* ont montré à partir de lignées cellulaires l'implication majeure de Src dans le développement du mélanome uvéal ¹²⁶.

L'approche kinomique peut être également utile pour l'identification des voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse et la résistance tumorale, ainsi que pour caractériser l'effet d'un nouvel agent antitumoral sur les kinases cellulaires. Roe *et al.* ont observé qu'une augmentation de l'activité de phosphorylation de STAT5 induite par HIF (facteur d'hypoxie) dans des cellules cancéreuses de prostate favorisait le développement des cancers de la prostate résistants à la castration ¹²⁷. Vivenco *et al.* ont montré que l'inactivation de PTEN causait une augmentation de la phosphorylation de l'EGFR, ce qui confère aux cellules un phénotype de résistance aux inhibiteurs de l'EGFR ¹²⁸. Enfin, Eriksson *et al.* ont rapporté pour deux lignées cellulaires de leucémie myéloïde aigue que l'effet cytotoxique de l'inhibiteur de tyrosine kinase AKN-028 dépendrait de l'activité basale de l'ensemble des tyrosine kinases. Ainsi, les cellules présentant une activité globale élevée des tyrosine kinases seraient plus sensibles à l'effet cytotoxique de AKN-028 ¹²⁹.

2.3.3 Recherche de biomarqueurs par approche kinomique

L'approche kinomique a largement été utilisée pour la recherche de biomarqueurs qui repose sur la mise en évidence de groupes de patients établis à partir des profils kinomiques. La plupart des études menées ont appliqué une méthodologie appelée communément « *on-chip* » qui consiste à mettre l'échantillon du patient en contact avec un inhibiteur de kinases dont la spécificité est bien sûr liée à l'étude des tyrosine kinases ou des sérine/thréonine kinases. L'objectif final est d'évaluer comme biomarqueur le « profil d'inhibition », qui correspond à la différence entre le profil obtenu *ex vivo* en présence ou non de l'inhibiteur de kinase.

Cette méthode « *on-chip* » a été élaborée pour répondre à une problématique largement rencontrée en kinomique, celui de la large variabilité interindividuelle des profils kinomiques bruts (sans inhibiteur). Lorsque les variations interindividuelles de ces profils sont trop importantes, il devient impossible de distinguer des groupes parmi la population de patients étudiée et par conséquent d'en déduire un biomarqueur. Les profils d'inhibitions obtenus suite à l'utilisation *on-chip* d'un inhibiteur de kinase permettent ainsi de diminuer la variation interindividuelle trouvée

initialement chez les patients et dans de nombreux cas, si l'inhibiteur est pertinent, de distinguer des groupes au sein des patients¹³⁰. L'hétérogénéité inter-patient est alors contournée en utilisant chaque échantillon comme son propre témoin.

Versele *et al.* ont été les pionniers dans la recherche de biomarqueurs à l'aide de l'approche kinomique¹³¹. En effet, ils ont montré à partir de lignées cellulaires et de modèles murins de xéno greffes que la signature phénotypique des tyrosine kinases pouvait prédire la réponse à un traitement par un inhibiteur multikinase. Cette étude a permis d'ouvrir la voie pour ce type d'approche chez les patients atteints d'un cancer. Chez 55 patients atteints d'un cancer rectal avancé, Saelen *et al.* ont étudié le profil kinomique des tyrosine kinases à partir de biopsies tumorales avant traitement¹³². La détection de cellules tumorales disséminées a pu être mise en évidence chez 60 % des patients qui en outre ont présenté ultérieurement une survie sans progression plus courte. Chez les patients n'ayant pas de cellules tumorales disséminées, la phosphorylation de 31 peptides était fortement inhibée *ex vivo* en présence de sunitinib. Ces résultats suggèrent donc qu'un phénotype de faible inhibition en présence de sunitinib est associé à une dissémination systémique plus rapide des cellules tumorales chez les patients atteints d'un cancer rectal avancé. Chez 66 patients atteints d'un cancer rectal avancé traités en néoadjuvant par chimiothérapie (5-fluorouracile, oxaliplatine et acide folinique) puis radiothérapie, Folkvord *et al.* ont étudié le profil d'activité des tyrosine kinases de biopsies tumorales avant chimiothérapie¹³³. Les profils kinomiques des 7 patients non répondeurs (*tumor regression grade*, TRG4) et de 12 patients bons répondeurs (TRG1-2) ont été utilisés pour construire un modèle de prédiction de la réponse. Les profils kinomiques des 47 patients restants (bons répondeurs ou répondeurs intermédiaires) ont été utilisés pour valider la robustesse du modèle. Pour 86 peptides, la phosphorylation était plus importante dans le groupe des non répondeurs. Au sein de la cohorte de validation externe, la prédiction du modèle s'est avérée juste dans 86 % des cas chez les bons répondeurs et 80 % des cas chez les répondeurs intermédiaires. Enfin, l'inhibition *ex vivo* par le sunitinib des tyrosine kinases était globalement plus significative dans le groupe des non répondeurs. Cependant, l'analyse *on-chip* n'a pas permis d'augmenter la justesse du modèle de prédiction. Ce type de modèle a également été décliné pour prédire la réponse à l'erlotinib chez des patients traités pour un CBNPC^{134,135}. Chez 47 patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires, Anderson *et al.* ont étudié le profil d'activité des tyrosine kinases de biopsies tumorales avant chirurgie¹³⁶. L'approche kinomique a permis de stratifier la cohorte de patients en 3 groupes distincts dont le taux de rechute dans les 3 groupes était respectivement 25 %, 6,3 % et

38 %. Néanmoins, ces résultats sont à interpréter avec précaution en raison de l'absence de données sur le traitement administré après chirurgie.

Enfin, différentes études ont été conduites pour la recherche de biomarqueurs, mais l'absence de données cliniques riches pour corroborer les résultats de l'approche kinomique reste un facteur limitant à leur interprétation. Ainsi, Anderson *et al.* ont pu identifier des signatures phénotypiques de tyrosine kinases pour caractériser les tumeurs résistantes à la radiothérapie ou au temozolomide ¹³⁷. La même équipe a identifié les tyrosine kinases FAK et BMX comme potentiels biomarqueurs chez des patients atteints de méningiome ¹³⁸. Enfin, Tahiri *et al.* ont étudié l'effet *ex vivo* du vemurafenib (inhibiteur spécifique de BRAF) sur le profil kinomique (tyrosine kinases) de tumeurs de mélanome sauvages ou mutées BRAFV600E ¹³⁹. Ils ont pu ainsi identifier pour 40 peptides une différence significative de phosphorylation entre les tumeurs sauvages et mutées BRAFV600E, bien que pour un faible nombre de tumeurs sauvages, le profil kinomique n'était pas distinct.

Au final, ces différentes études montrent le potentiel de l'approche kinomique pour la recherche de biomarqueurs. Néanmoins, l'utilisation d'une biopsie tumorale comme matrice biologique représente à terme un facteur limitant pour le développement de l'utilisation de l'approche kinomique en pratique clinique, tout particulièrement après l'instauration du traitement.

2.3.4 Intérêt des cellules mononucléées du sang périphérique pour la recherche de biomarqueurs

Dans une perspective de médecine de précision, la recherche de biomarqueurs doit être réalisable facilement, de façon à pouvoir guider le clinicien lors de la prise en charge en routine des patients traités pour un cancer. Le matériel sur lequel la recherche de biomarqueurs s'effectue, doit donc être facilement accessible et peu invasif pour le patient. De ce fait, la réalisation de multiples biopsies au cours du traitement apparaît inenvisageable aussi bien sur un aspect pratique qu'éthique. Par ailleurs, une des difficultés ultérieures à la biopsie est d'isoler de façon la plus fine possible les cellules tumorales par rapport au stroma. Dans ce contexte, l'identification d'une matrice biologique de substitution à la biopsie tumorale représente actuellement un enjeu majeur.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) qui constituent une fraction des cellules sanguines facilement accessibles par une simple prise de sang, de façon peu invasive et répétable.

Elles rassemblent 70 à 90 % de lymphocytes (lymphocytes B et T et cellules *natural killer*) ainsi que 10 à 30% de monocytes et très peu de cellules dendritiques ¹⁴⁰.

Des études utilisant des analyses génomiques par *microarrays* ont montré que les CMSP exprimaient une large proportion de gènes codés par le génome humain, et que leur expression pouvait varier face à des stimuli internes ou externes et reflétaient les adaptations métaboliques et physiologiques ^{141,142}. Par ailleurs, des différences d'expression moléculaires au sein des CMSP peuvent apparaître très tôt dans le processus néoplasique, dès que les mécanismes de reconnaissance tumorale ou d'échappement immunitaire sont mis en jeu. En effet, ces changements moléculaires ont été retrouvés chez des patients atteints de différents cancers de stades précoces ¹⁴³⁻¹⁴⁵. Il est important de noter que ces variations au sein des CMSP ne sont pas dépendantes de la charge tumorale, ce qui est actuellement l'inconvénient majeur des cellules circulantes utilisées comme biomarqueur ¹⁴⁵. Enfin, les CMSP présentent l'avantage de mesurer à différents moments les changements pharmacodynamiques liés à des thérapies ⁹⁹. Dans ce contexte, les CMSP semblent être un matériel de substitution ou « *surrogate tissue* » de choix pour la recherche de biomarqueurs chez des patients atteints de cancer.

CHAPITRE 2

ENJEUX DE DEUX NOUVELLES THERAPIES CIBLEES ANTITUMORALES : LE SUNITINIB ET LE NIVOLUMAB

CHAPITRE 2 : ENJEUX DE DEUX NOUVELLES THERAPIES CIBLEES ANTITUMORALES : LE SUNITINIB ET LE NIVOLUMAB

1 Le sunitinib dans le traitement du cancer du rein métastatique

1.1 Généralités sur le cancer du rein

1.1.1 Epidémiologie

Le cancer du rein représente 3 % des cancers de l'adulte dans les pays occidentaux. En France, il se situe au 7ème rang des cancers, tout sexe confondu. En 2012, environ 11600 nouveaux cas ont été estimés, dont 67 % chez l'homme. L'incidence du cancer du rein est en augmentation constante depuis 1980. En effet, le taux d'incidence standardisé augmente chez l'homme de 2,0 % par an et chez la femme de 1,7 % par an depuis 1980. Le cancer rénal se situe au 9ème rang des décès par cancer avec 3957 décès recensés en 2012 ¹⁴⁶. Le tabagisme, l'hypertension artérielle ainsi que l'obésité sont les principaux facteurs de risque du cancer rénal. Enfin, 2 à 3 % des cancers rénaux correspondent à des formes familiales héréditaires ¹⁴⁷.

1.1.2 Types histologiques

L'organisation mondiale de la santé (OMS) identifie différents sous-types histologiques de carcinome à cellules rénales (CCR). Les plus fréquemment observés sont les suivants ¹⁴⁸ :

- les carcinomes rénaux à cellules claires (CCRcc) (70-85 %)
- les carcinomes tubulo-papillaires (7-15 %)
- les carcinomes chromophobes (5-10 %)

Ces dernières années, l'apport de la cytogénétique a permis la distinction de nouveaux sous-types de carcinomes rénaux, répertoriés dans la classification de Vancouver établie par l'*International*

Society of Urological Pathology ¹⁴⁹. La caractérisation de la tumeur est essentielle à l'évaluation du pronostic des patients et au choix du traitement.

Il est difficile d'évaluer le nombre de tumeurs rénales d'emblée métastatiques. Toutefois, il est estimé que 10 à 40 % des patients présentent des métastases au moment du diagnostic. Le CCRcc est le sous-type histologique le plus souvent responsable de métastases ¹⁵⁰.

Le pourcentage de métastases faisant suite à la chirurgie est compris entre 30 et 40 % avec un délai médian d'apparition de 15 mois. D'autre part, il est décrit que 43, 80 et 93 % des métastases se développent respectivement après 1, 3 et 5 ans ¹⁵¹.

La dissémination métastatique se fait principalement au niveau pulmonaire et également au niveau du foie, des os, du cerveau et des glandes surrénales.

1.1.3 Physiopathologie du cancer du rein

1.1.3.1 Anomalies moléculaires dans le cancer du rein

❖ La voie VHL-HIF-VEGF

La perte de fonction du gène suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL) est retrouvée dans environ 50 % des CCRcc sporadiques ¹⁵².

Ce gène code pour la protéine VHL (pVHL) qui joue un rôle important dans la réponse cellulaire face à l'hypoxie en régulant le facteur de transduction HIF (*hypoxia-inducible factor*). HIF est un hétérodimère composé de deux sous-unités α (HIF α) et β (HIF β). La sous-unité β est exprimée de façon constitutive ¹⁵³.

En condition de normoxie (Figure 18), HIF α est hydroxylée par la propyl-hydroxylase (PHD) en présence d'oxygène. Puis, elle se fixe au complexe E3 ubiquitine ligase, dont fait partie la pVHL. Ceci induit la poly-ubiquitinylation de HIF α qui est alors reconnue puis dégradée par le protéasome.

En condition d'hypoxie ou d'inactivation de VHL, la PHD est inactive et la dégradation de HIF α est ralentie. Ceci conduit à l'accumulation cytoplasmique de HIF α qui se dimérise avec HIF β . Le complexe se transloque dans le noyau cellulaire et se lie à une courte séquence d'ADN appelée HRE (*Hypoxia Response Element*), résultant en la transcription de nombreux gènes dont ceux des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le PDGF ¹⁵⁴. Ceci a pour conséquence l'initiation de l'angiogenèse.

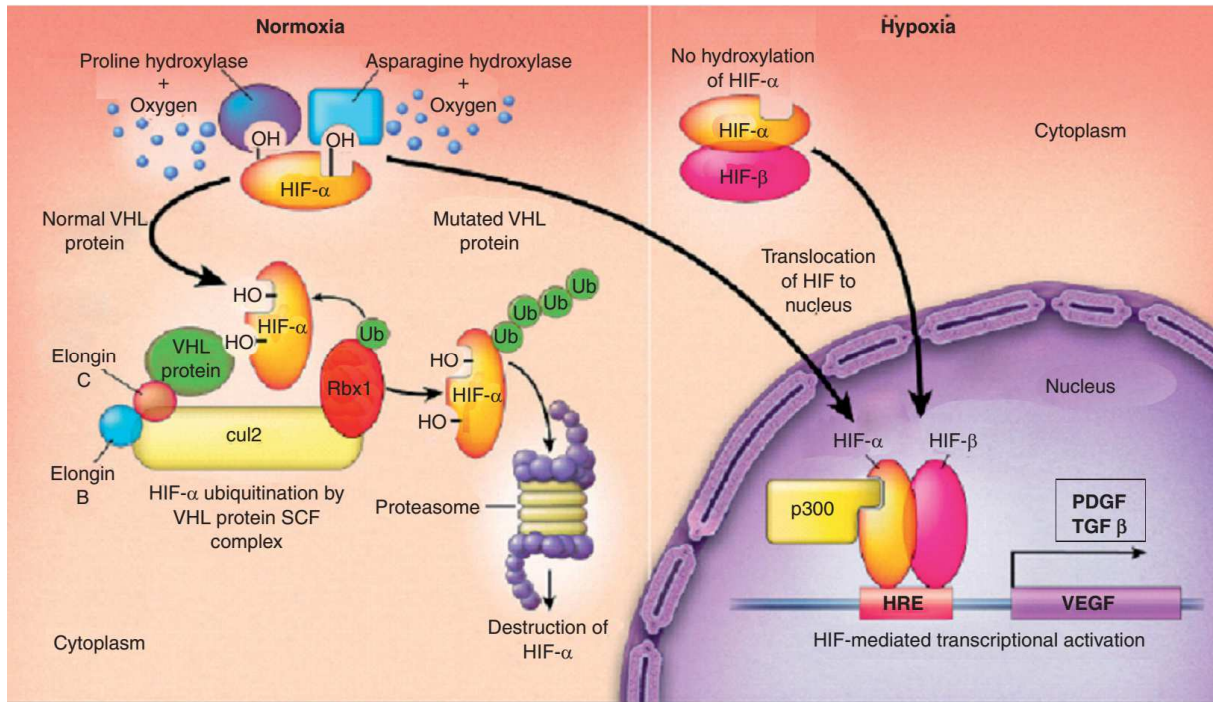


Figure 18 : Mécanismes impliqués dans l'accumulation d'HIF, d'après ¹⁵⁵.

En condition de normoxie (à gauche), l'HIF α est dégradée par le protéasome. En condition d'hypoxie ou anomalie de la protéine VHL, l'HIF α s'accumule et induit l'activation d'une centaine de gènes (HRE) dont VEGF et PDGF. Cul2 : cullin2, HIF : hypoxia-inducible factor, HRE : hypoxia response element, PDGF : platelet derived growth factor, Rbx1 : RING-box protein 1, Ub : ubiquitine, VEGF : vascular endothelial growth factor, VHL : von Hippel Lindau,

❖ La voie PI3K-Akt-mTOR

La voie PI3K-Akt-mTOR (Figure 19) joue également un rôle dans le processus d'oncogenèse ¹⁵⁶. Elle peut être activée par des facteurs de croissance, suite à une mutation ou surexpression de PI3K ou d'Akt ou suite à une perte de fonction de PTEN qui est un régulateur négatif de cette voie ^{157,158}. Ceci entraîne une augmentation globale de la synthèse de protéines, notamment des cyclines, impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire ¹⁵⁹. De la même manière, l'activation de mTOR augmente l'expression d'HIF α , ce qui stimule la sécrétion de VEGF ¹⁶⁰. Par conséquent l'activation de cette voie est indirectement responsable de l'angiogenèse.

1.1.4 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique du CCR est déterminée en fonction de l'état général du patient ainsi que de la localisation, de l'histologie et du stade de la tumeur. Ce dernier est déterminé selon la classification TNM (*tumor node metastasis*) de l'*Union for International Cancer Control* (UICC).

Les recommandations actuelles pour le traitement des tumeurs rénales sont celles de l'*European Association of Urology* (EAU) ¹⁶¹ et de l'*European Society for Medical Oncology* (ESMO) ¹⁴⁷ au niveau européen, et celles du Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie (CCAFU) au niveau national ¹⁵¹.

Le CCR est peu sensible à la radiothérapie ainsi qu'à la chimiothérapie. Sa prise en charge repose donc principalement sur la chirurgie, qui constitue le traitement de référence pour les formes localisées ou localement avancées. En revanche, les thérapies systémiques représentent le « *gold standard* » pour le traitement des stades métastatiques.

1.1.4.1 Le score de Heng

Dans le cas d'un CCRm, le choix du traitement se fait également en fonction du groupe pronostique auquel appartient le patient (Tableau 3). Ce dernier est défini grâce à la classification de Heng qui tient compte de 6 facteurs de risque ¹⁶² :

- Etat général mauvais (Index de Karnofsky inférieur à 80 %)
- Hémoglobinémie inférieure à la normale
- Délai entre le diagnostic et l'instauration du traitement inférieur à un an
- Calcémie corrigée supérieure à la normale
- Thrombocytémie supérieure à la normale
- Taux de neutrophiles supérieur à la normale

Tableau 3 : Classification de Heng et survie globale ¹⁶².

Nombre de facteurs de risque	Groupe pronostique	Médiane de la survie globale (mois)	Survie globale à 2 ans (%)
0	Bon	43	75
1-2	Intermédiaire	27	53
3-6	Mauvais	8.8	7

Le CCR est un cancer résistant à la chimiothérapie cytostatique classique. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires du cancer du rein a permis la mise au point de thérapies dites "ciblées", qui représentent une avancée majeure dans la prise en charge du CCRm.

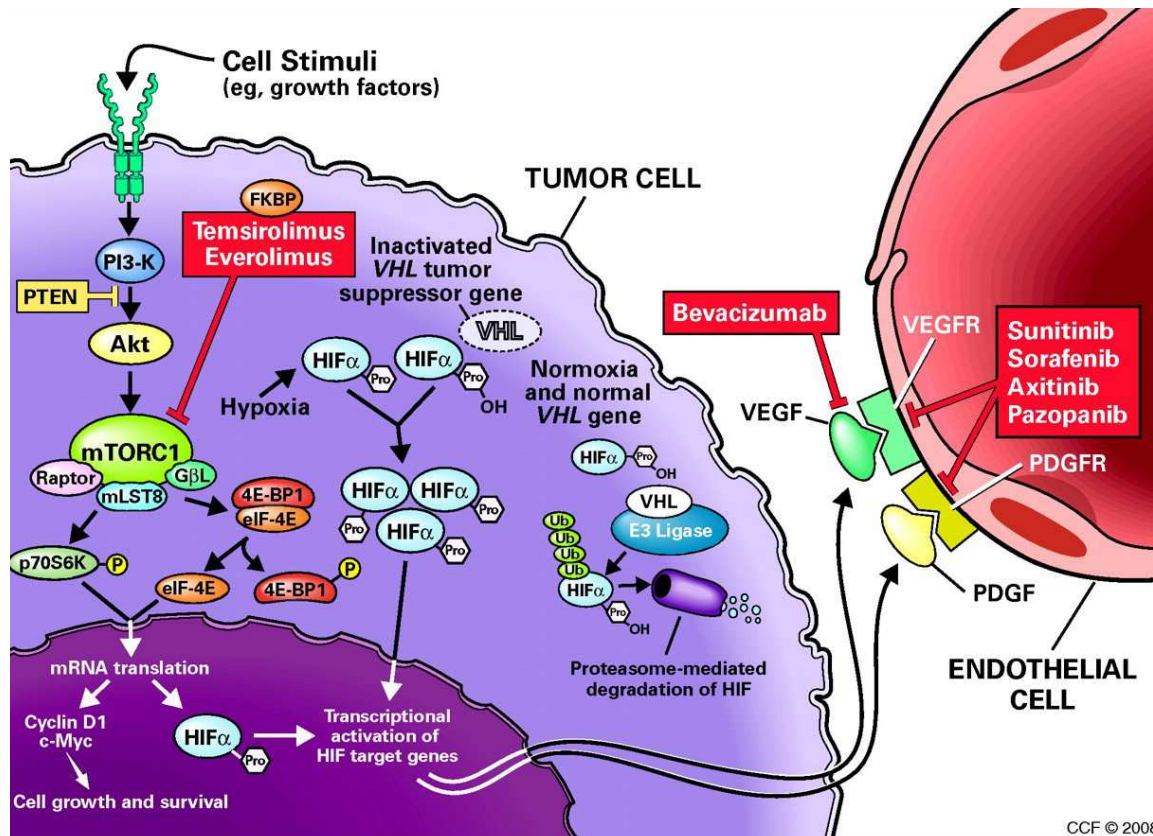
Les traitements médicamenteux utilisés incluent l'immunothérapie et les thérapies ciblées. La stratégie thérapeutique médicamenteuse pour le CCR est résumée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résumé de la stratégie thérapeutique médicamenteuse du carcinome rénal métastatique, selon les recommandations européennes.

Histologie	Ligne de traitement	Groupe pronostique	Standard	Option
<i>Carcinome rénal à cellules claires</i>	Première ligne	Bon et intermédiaire	Sunitinib Bevacizumab +IFN α Pazopanib	IL-2 à haute dose Sorafenib Bevacizumab + faible dose IFN α
		Mauvais	Temsirolimus	Sunitinib Sorafenib Sunitinib
	Seconde ligne	Post antiangiogénique Tous	Nivolumab Axitinib Sorafenib Pazopanib	
		Post cytokines Tous post ITK	Axitinib Everolimus	Sorafenib
<i>Carcinome rénal non à cellules claires</i>		Tous		Sunitinib Sorafenib Temsirolimus

1.1.4.2 Les thérapies ciblées

Les molécules utilisées en thérapie ciblées possèdent une action spécifique sur des cibles cellulaires impliquées dans la croissance tumorale et présentent par conséquent moins d'effets indésirables que les chimiothérapies conventionnelles. La Figure 19 décrit les différentes thérapies ciblées en relation avec les anomalies moléculaires retrouvées dans le carcinome rénal, décrites précédemment.



CCF © 2008

Figure 19 : Mécanisme d'action des thérapies ciblées dans le cancer du rein métastatique ¹⁶³.

Akt : protein kinase B, *HIF* : hypoxia-inducible factor, *mTOR* : mammalian target of rapamycin, *PDGF* : platelet derived growth factor, *PI3K* : phosphoinositide 3-kinase, *PTEN* : Phosphatase and TENsin homog, *Raptor* : regulatory-associated protein of *mTOR*, *VEGF* : vascular endothelial growth factor, *VHL* : von Hippel Lindau,

❖ Inhibiteurs de l'angiogénèse

L'angiogénèse tumorale étant indispensable à la croissance et à l'extension tumorale, la voie du VEGF apparaît donc comme une cible thérapeutique de choix.

- Inhibiteur du VEGF

Le bevacizumab (Avastin[®]) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A, empêchant ce dernier de se fixer à son récepteur. Il est utilisé en bithérapie avec l'IFN α .

- Inhibiteurs du VEGFR

En 2007, la prise en charge du CCRm a été révolutionnée par l'arrivée des inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK). Ils agissent sur la partie intracellulaire des récepteurs au VEGF. Ils se fixent dans la poche à ATP du VEGFR et entrent ainsi en compétition avec l'ATP nécessaire à la réaction de phosphorylation. Ces molécules passent en général assez bien les membranes. En raison de leur faible spécificité, elles sont capables d'inhiber différentes kinases. On peut ainsi les qualifier d'inhibiteurs multikinases et sont par conséquent utilisées en monothérapie. Le sunitinib

(Sutent[®]), le pazopanib (Votrient[®]), le sorafenib (Nexavar[®]) et l'axitinib (Inlyta[®]) sont les molécules ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le traitement en 1^è ou 2^è ligne du carcinome rénal avancé ou métastatique. Le cabozantinib (Cometriq[®], Cabometyx[®]) a été récemment approuvé par la FDA en 2^è ligne du carcinome rénal avancé ou métastatique.

❖ Inhibiteurs de mTOR

Le temsirolimus (Torisel[®]) et l'évérolimus (Afinitor[®]) sont des dérivés de la rapamycine inhibant mTOR. Ils agissent via la formation d'un complexe avec la protéine intracellulaire FKBP-12 (FK-Binding Protein 12). Ce dernier est alors capable d'inhiber l'activité du mTOR complex-1 (mTORC-1) et ainsi d'inhiber la progression du cycle cellulaire ainsi que l'angiogenèse, de manière indirecte ¹⁶⁴.

1.1.5 L'immunothérapie

Le CCR est considéré comme étant une tumeur immunogène. C'est un cancer infiltré par de nombreuses cellules immunitaires comprenant des lymphocytes T, des NK, des cellules dendritiques ainsi que des macrophages. Malgré cette infiltration importante, le CCR n'est généralement pas éliminé par ces cellules immunitaires. En effet, il a été démontré que cette tumeur mettait en jeu différents mécanismes pour échapper au système immunitaire de l'hôte et ainsi empêcher la réponse anti-tumorale ¹⁶⁵. Des changements au niveau de la différenciation des cellules dendritiques ainsi que l'induction de gènes associés à l'anergie au sein des lymphocytes, semblent être en partie impliqués dans l'altération de la réponse tumorale ¹⁶⁶.

Jusqu'en 2007, le seul traitement disponible pour traiter le CCRm était l'immunothérapie incluant l'interféron alpha (IFN α , IntronA[®], Roféron[®]) et l'interleukine 2 (IL-2, Proleukin[®]). Ces traitements ne possédaient qu'une activité très limitée, avec une réponse objective obtenue chez seulement 5 % des patients. Seulement 10 % des patients traités par IL-2 présentaient une stabilisation voire une rémission de leur maladie, de longue durée ¹⁶⁷. Par ailleurs, ces molécules sont responsables de nombreuses toxicités qui altèrent la qualité de vie des patients ¹⁶⁸. A ce jour, l'IFN α est toujours utilisé en association avec le bevacizumab.

Récemment, une meilleure compréhension de l'immunité pro-tumorale a permis de montrer que la tumeur était capable d'activer un système de contrôle « *checkpoint* » capable de stopper l'activation des lymphocytes, ceci résultant en un échappement au système immunitaire. Il a été ainsi montré que les cellules tumorales de CCR exprimaient fortement le PD-L1 (ligand du

programmed death 1) à leur surface. Ainsi, le nivolumab (Optivo[®]), anticorps monoclonal humain dirigé contre le récepteur PD-1 (*programmed death 1*), a été comparé à l'évérolimus lors d'un essai clinique randomisé de Phase III chez des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires avancé ou métastatique ayant préalablement reçu un antiangiogénique. Le nivolumab a montré une survie globale supérieure à celle de l'évérolimus 25,0 *vs* 19,6 mois respectivement (le hazard ratio était de 0,73 [intervalle de confiance 98,5 %, 0,57–0,93] ; $p=0,002$), ainsi que moins d'effets indésirables sévères (19 % *vs* 37 % de toxicité de grade 3 ou 4, respectivement)¹⁶⁹. Suite à ces résultats, le nivolumab a obtenu son AMM en 2016 dans le traitement du CCRm en seconde ligne après traitement antiangiogénique.

D'autres essais sont en cours afin d'évaluer l'association du nivolumab avec un inhibiteur de tyrosine kinase ou l'ipilimumab (Yervoy[®]) (anticorps anti-CTLA-4).

1.2 Le sunitinib

1.2.1 Structure chimique

Le sunitinib (Sutent[®]) appartient à la classe chimique des indoline-2-ones (Figure 20). Il a pour formule brute $C_{22}H_{27}FN_4O_2$ et son poids moléculaire est de 398,5 g/mole. Selon la nomenclature IUPAC, il s'agit du N-[2-(diéthylamino)ethyl]-5-[[[(3Z)-5-fluoro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene]methyl]-2,4-diméthyl-1H-pyrrole-3-carboxamide. Il est intéressant de souligner que la partie diéthylaminoéthyle n'a été introduite que pour permettre la formation de sel et n'est absolument pas indispensable pour la fixation au VEGFR2. Il est ainsi commercialisé sous forme de malate.

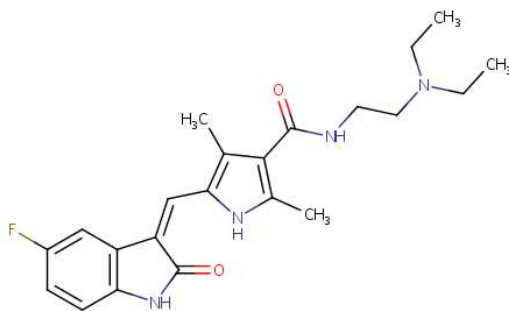


Figure 20 : Structure chimique du sunitinib.

1.2.2 Activité pharmacologique

Le sunitinib possède différentes cibles incluant entre autres les VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, le PDGFR, le facteur de croissance des cellules souches (Kit), la Fms-like tyrosine kinase (Flt-3), le récepteur 1 au facteur de stimulation de colonies (CSF-1R) et RET. Les différentes concentrations de sunitinib capables d'inhiber 50 % de l'activité tyrosine kinase, déterminées à partir de protéines purifiées sont résumées dans le Tableau 5¹⁷⁰. A noter cependant que, malgré ce qui peut être lu dans la littérature, ces IC₅₀ ne sont pas comparables entre elles puisqu'il s'agit d'enzymes différentes.

Tableau 5 : Concentration de sunitinib capable d'inhiber 50 % de l'activité tyrosine kinase (IC₅₀) sur les principales protéines kinases cibles¹⁷⁰.

Cible	IC50 (nM)
VEGFR1	15
VEGFR2	38
VEGFR3	30
PDGFR α	69
PDGFR β	55
CSF-1R	35
Flt-3	21
c-Kit	5
Ret	224

c-Kit : facteur de croissance des cellules souches ; CSF : Colony stimulating factor 1 receptor ; Flt-3 : Fms-like tyrosine kinase 3 ; IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50 ; PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor ; RET : rearranged during transfection ; VEGFR : vascular endothelial growth factor receptors.

1.2.3 Indications thérapeutiques

Le sunitinib a obtenu son AMM en janvier 2006. Il est indiqué en monothérapie dans le traitement en 1^{ère} ligne du cancer rénal localement avancé ou métastatique, à la posologie de 50 mg/j durant 4 semaines suivies de deux semaines de fenêtre thérapeutique.

De par son pouvoir inhibiteur de c-Kit, il est également approuvé à la même posologie dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) résistantes à l'imatinib (Glivec[®]) ou chez les patients intolérants à l'imatinib. Dans les tumeurs neuroendocrines du pancréas, le schéma posologique est différent puisque les patients sont traités en continu à la posologie de 37,5 mg/j.

1.2.4 Pharmacocinétique

Le sunitinib est administré par voie orale. Il est lentement absorbé au niveau du tractus digestif. La concentration plasmatique maximale est obtenue entre 6 et 12 heures ¹⁷¹ après l'ingestion du médicament. Sa biodisponibilité absolue n'est pas connue en raison de l'absence de la forme intra-veineuse. Cependant, elle ne semble pas être affectée par la prise concomitante de nourriture. Il possède un large volume de distribution (2230 L) ¹⁷² indiquant une distribution tissulaire. Le sunitinib est fortement métabolisé par monodéthylation par le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) en un métabolite actif, le N-deséthyl-sunitinib (SU12662), qui est à son tour métabolisé par le CYP3A4 en métabolites inactifs. Le sunitinib et le SU12662 se fixent fortement aux protéines plasmatiques (95 et 90 %, respectivement), principalement à l'albumine. Le sunitinib et le SU12662 sont lentement éliminés par la voie hépato-biliaire avec des demi-vies d'élimination respectives de 40-60 heures et de 80-110 heures ¹⁷³. La pharmacocinétique du sunitinib est sujette aux variations circadiennes. Kloth *et al.* ont observé chez 12 patients que la concentration résiduelle de sunitinib était significativement plus élevée quand le médicament était administré à 13h00 ou 18h00 plutôt qu'à 8 h du matin ¹⁷⁴. Ainsi, les concentrations résiduelles de sunitinib étaient de 66,0 ng/mL, 58,9 ng/mL et 50,7 ng/mL, respectivement (p=0,006). En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour l'aire sous la courbe (ASC) entre les 3 heures de prise.

Le sunitinib présente une large variabilité interindividuelle de sa pharmacocinétique. Une méta-analyse réalisée à partir de données issues de volontaires sains et de patients atteints de tumeurs solides avancées traités par sunitinib a permis d'estimer par une approche de population l'ensemble des paramètres pharmacocinétiques du sunitinib et du SU12662 (Tableau 6) ¹⁷⁵.

Tableau 6 : Valeurs estimées des paramètres pharmacocinétiques du sunitinib et de son métabolite SU12662 ¹⁷⁵.

Paramètres	Valeur estimée (CV)	
	<i>Sunitinib</i>	<i>SU12662</i>
k_a (h ⁻¹)	0,20 (80 %)	0,29 (86 %)
CL (L.h ⁻¹)	51,8 (38 %)	29,6 (47 %)
Vd (L)	2030 (43 %)	3080 (59 %)
$t_{1/2}$ (h)	69 (9 %)	80 (28 %)

CL, clairance ; CV, coefficient de variation ; h, heure ; L, litre ; L.h-1, litre/heure ; k_a , constante d'absorption ; Vd, volume de distribution ; $t_{1/2}$, demi-vie d'élimination

Récemment, un modèle pharmacocinétique semi-physiologique a été proposé pour décrire la pharmacocinétique du sunitinib et du SU12662¹⁷⁶. La variabilité interindividuelle de la clairance du sunitinib et du SU12662 était de 34 % et 42 % respectivement.

En pratique clinique quotidienne, cette large variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du sunitinib et du SU12662 se caractérise, respectivement, par des coefficients de variation de l'ordre de 50 % et 40 % pour la concentration plasmatique composite (sunitinib + SU12662) résiduelle et l'aire sous la courbe (ASC)¹⁷⁷.

1.2.5 Efficacité clinique

Le sunitinib a été comparé à l'IFN α lors d'une étude internationale randomisée multicentrique de Phase III chez des patients atteints d'un CCRm¹⁷⁸. Les sept cent cinquante patients inclus recevaient soit du sunitinib par voie orale à la posologie de 50 mg par jour pendant 4 semaines suivies de 2 semaines de fenêtre thérapeutique (n=375) ; soit 9MU d'IFN α 3 fois par semaine (n=375). Les patients ont été traités jusqu'à progression de la maladie ou jusqu'à la sortie de l'étude.

L'analyse comparative a montré pour le groupe ayant reçu le sunitinib une augmentation statistiquement significative de la survie sans progression (11 *vs* 5 mois, $p < 0,001$). Selon les critères RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), les patients traités par sunitinib présentaient également une meilleure réponse objective (réponse partielle + réponse complète) que les patients traités par IFN α (47 *vs* 12 %, $p < 0,001$) (Tableau 7). Enfin, la survie globale était plus longue dans le bras sunitinib (26,4 *vs* 21,8 mois, $p = 0,051$)¹⁷⁸.

Tableau 7 : Réponse tumorale et survie sans progression. Sunitinib versus IFN α , d'après Motzer *et al*¹⁷⁸.

Réponse	Sunitinib (n=375)		IFN α (n=375)	
	Nombre patients	%	Nombre patients	%
Réponse objective	176	47	46	12
- Réponse complète	11	3	4	1
- Réponse partielle	165	44	42	11
Maladie stable	150	40	202	54
Progression	26	7	69	18
Données manquantes	23	6	58	15
Survie sans progression				
- Médiane, mois	11		5	
- IC 95%, mois	11 à 13		4 à 6	

IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %

1.2.6 Tolérance

Cette étude de Phase III pivot a également permis d'évaluer le profil de tolérance des patients traités par sunitinib selon le NCI-CTCAE v 3.0 (*National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events*)¹⁷⁸.

Des effets indésirables graves (grade 3 ou 4) ont été rapportés chez 24 % des patients recevant du sunitinib et chez 7 % des patients recevant l'IFN α ¹⁷³. Le taux d'arrêt du traitement lié à ces toxicités sévères était de 19 % dans le bras sunitinib et 23 % dans le bras IFN α . Enfin, des réductions de doses ont eu lieu chez 50 % des patients traités par sunitinib et chez 27 % des patients traités par IFN α ¹⁷⁸.

Les effets indésirables du sunitinib gradés selon le NCI-CTCAE v 3.0 sont résumés dans le Tableau 8. Les toxicités sévères les plus fréquemment observées sont : la fatigue, le syndrome mains-pieds, l'hypertension artérielle, l'hypothyroïdie, la diarrhée et la thrombopénie. Parmi ces toxicités, sont retrouvés des effets indésirables dits de « classe », communs aux inhibiteurs de l'angiogenèse : hypertension artérielle, thrombose et toxicité rénale.

Tableau 8 : Effets indésirables du sunitinib les plus fréquents et gradés selon le NCI-CTCAE v 3.0, d'après Motzer et al ¹⁷⁸.

Effets indésirables	Tous grades (%)	Grade 3 (%)	Grade 4 (%)
Diarrhée	61	9	0
Fatigue	54	11	0
Hypertension artérielle	30	12	0
Mucite	30	1	0
Syndrome mains-pieds	29	9	0
Modification couleur peau	27	<1	0
Modification couleur cheveux	20	0	0
Hypothyroïdie	14	2	0
Toxicité cardiaque (diminution fraction d'éjection)	13	3	0
Leucopénie	78	8	0
Neutropénie	77	16	2
Anémie	79	6	2
Thrombopénie	68	8	1
Lymphopénie	68	16	2
Elévation de la lipase	56	15	3
Elévation de la créatinine	70	<1	<1

1.2.7 Relation pharmacocinétique/pharmacodynamie

Plusieurs études cliniques ont pu mettre en évidence l'existence d'une relation entre la concentration plasmatique et la réponse (efficacité ou toxicité) au traitement par sunitinib chez des patients traités pour CCRm ¹⁷⁹.

1.2.7.1 Efficacité

Concernant l'efficacité du sunitinib dans le traitement du CCRm, Houk *et al.* ont rapporté une relation entre l'ASC composite (sunitinib+SU12662) et la réponse objective (réponse partielle ou complète) chez 146 patients traités pour CCRm ¹⁸⁰. Ainsi, une ASC composite de 1500 ng/mL.h⁻¹ permettrait d'avoir une réponse objective dans 80 % des cas. De plus, les mêmes auteurs ont montré qu'une ASC de sunitinib \geq 800 ng/mL.h⁻¹ augmentait significativement le temps jusqu'à progression (p=0,001) et la survie globale (p=0,01) ¹⁸⁰. Récemment, Narjoz *et al.* ont confirmé

que la survie globale était approximativement deux fois plus longue chez les patients présentant une ASC composite $> 1973 \text{ ng/mL.h}^{-1}$ à J21 après l'initiation du traitement (35,2 mois *vs* 16,7 mois, $p=0,0051$)¹⁸¹. Enfin, Faivre *et al.* ont rapporté une efficacité thérapeutique moindre du sunitinib chez des patients caucasiens présentant une concentration résiduelle composite inférieure à 50 ng/mL ¹⁸². Enfin, les patients présentant une concentration résiduelle composite supérieure à 100 ng/mL avaient une SSP plus courte que ceux présentant une concentration inférieure à 100 ng/mL . (médiane SSP 748 *vs* 238 jours, $p=0,02$) en raison de l'arrêt précoce du traitement pour des toxicités sévères¹⁸³.

1.2.7.2 Toxicité

Diverses études cliniques ont rapporté que la survenue de toxicités de grade ≥ 3 était plus fréquente chez les patients fortement exposés au sunitinib et au SU12662¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Par ailleurs, il existerait une relation entre l'ASC du sunitinib et la survenue d'effets secondaires tels que la neutropénie, la fatigue, l'hypertension artérielle, des mucites et l'anorexie^{180,183,185}. Les thrombopénies de grade ≥ 2 seraient plus fréquentes chez les patients fortement exposés au SU12662 (Odd ratio : 1,27 ; $p=0,028$)¹⁸¹ ou présentant une concentration résiduelle de sunitinib $\geq 90 \text{ ng/mL}$ ¹⁸⁶. Enfin, une concentration résiduelle composite supérieure à 100 ng/mL serait un facteur de risque de thrombopénie de grade ≥ 2 chez les patients asiatiques¹⁸⁷.

1.2.8 Variabilité interindividuelle de réponse

Les données obtenues lors des différents essais cliniques ont permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité interindividuelle de la réponse clinique, en termes d'efficacité ou de toxicité, chez les patients traités par sunitinib. Ainsi, environ 30 % des patients traités par sunitinib possèdent une résistance primaire intrinsèque¹⁸⁸. Parmi les 70 % de patients présentant une réponse initiale au traitement, une variabilité interindividuelle de réponse est observée¹⁷⁸. Cette dernière est d'autant plus importante en pratique quotidienne chez des patients non sélectionnés qui sont plus fragiles (âge avancé, nombreuses comorbidités) et à risque en termes d'interactions pharmacocinétiques. De plus la majorité des patients développe une résistance secondaire après 6 à 15 mois de traitement par sunitinib¹⁶³. Par ailleurs, certains patients présentent des toxicités sévères, décrites plus haut, menant à un arrêt définitif dans 8 % des cas ou à une diminution de la dose dans 32 % des cas¹⁸⁹. Ces toxicités sont d'autant plus fréquentes et sévères chez les patients en dehors des essais cliniques en raison de leur plus grande fragilité.

Cette variabilité interindividuelle de réponse au traitement peut être due à la large **variabilité interindividuelle pharmacocinétique du sunitinib et de son métabolite actif, le SU12662** ou à des altérations au niveau moléculaire.

1.2.8.1 *Facteurs de variabilité pharmacocinétique*

Etant donné qu'une relation pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) a été clairement rapportée dans la littérature^{179,190}, une sous-exposition plasmatique au traitement peut résulter en une mauvaise réponse au traitement, tandis qu'une surexposition peut induire la survenue d'épisodes toxiques sévères. La large variabilité interindividuelle pharmacocinétique du sunitinib et du SU12662 contribue donc probablement à la différence des résultats cliniques observés d'un patient à l'autre.

Différents facteurs peuvent influencer l'absorption digestive, le métabolisme ou encore l'élimination du sunitinib et du SU12662.

❖ Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques du patient

Une étude de pharmacocinétique de population a permis d'identifier le poids total, le sexe, l'ethnie, le type de tumeur et l'indice de performance ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) comme des facteurs contribuant à la variabilité pharmacocinétique interindividuelle¹⁷⁵. Cependant, l'impact de ces différents facteurs sur la pharmacocinétique du sunitinib et du SU12662 semble au final négligeable. En revanche, Narjoz *et al.* ont récemment rapporté que la masse maigre est un paramètre expliquant 24 % de la variabilité interindividuelle de l'exposition composite¹⁸¹. Ainsi, une faible masse maigre résulte en une exposition plus importante au sunitinib et au SU12662, ce qui corrobore l'incidence plus élevée de toxicités dose-limitantes chez les patients sarcopéniques¹⁹¹. Enfin, Chae *et al.* ont récemment montré que la surface corporelle influençait significativement la clairance apparente du sunitinib chez des patients asiatiques traités à la dose de 37,5 mg/j pour CCRm¹⁹².

❖ Polymorphismes génétiques

La fréquence d'expression du CYP3A5, dont le sunitinib est substrat^{184,193}, est de l'ordre de 20 % chez les patients caucasiens, 40 à 50 % chez les patients asiatiques et de 90 % chez les patients africains¹⁹⁴. Dans ce contexte, l'expression du CYP3A5 chez certains patients pourrait causer une augmentation de la clairance d'élimination du médicament et donc une sous-exposition

plasmatique au médicament. Ainsi, une étude récente a montré que la clairance au sunitinib était augmentée de 22,5 % chez les patients qui expriment du CYP3A5¹⁸⁴.

Par ailleurs, le sunitinib est un substrat de la P-glycoprotéine (Pgp), protéine d'efflux appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), et de la *breast cancer resistance protein* (BCRP), codées par les gènes ABCB1 et ABCG2 respectivement¹⁹⁵. Ces protéines d'efflux sont localisées notamment au sein de l'épithélium digestif et de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Des polymorphismes génétiques de ces protéines peuvent engendrer des modifications significatives de leur fonctionnalité et de ce fait altérer l'absorption et l'élimination du sunitinib et du SU12662 chez les patients porteurs d'une telle mutation.

Ainsi, différentes équipes ont montré que le génotype d'ABCG2 (421C>A) influençait significativement la pharmacocinétique du sunitinib et du SU12662, en augmentant l'exposition plasmatique au sunitinib^{181,186}. Enfin, le génotype d'ABCB1 (rs2032582) a récemment été identifié comme influençant la clairance apparente du sunitinib chez des patients asiatiques traités à la dose de 37,5 mg/j pour CCRm¹⁹².

❖ Interactions médicamenteuses

Du fait des voies métaboliques du sunitinib, des interactions pharmacocinétiques sont à prévoir avec les inhibiteurs ou les inducteurs du CYP3A4^{196,197}, avec pour conséquences respectives l'augmentation ou la diminution de l'exposition plasmatique des patients au médicament. Ainsi, l'administration concomitante d'inducteurs enzymatiques du CYP3A4 tels que l'ifosfamide ou la rifampicine résulte en une diminution significative de l'exposition plasmatique du sunitinib^{198,199}. Enfin, Da Silva *et al.* ont rapporté que l'administration concomitante de nicardipine (inhibiteur modéré du CYP3A4) augmentait de près de 50 % la concentration plasmatique du sunitinib²⁰⁰. En revanche, la prise d'inhibiteurs de la pompe à protons, d'anti-acide ou d'anti-histaminique H2 n'entraîne pas de variations significatives de la biodisponibilité du sunitinib²⁰¹.

❖ Observance

Les thérapies ciblées antitumorales administrées par voie orale sont des traitements longs et ambulatoires, le patient doit donc gérer seul son traitement ainsi que les éventuels effets indésirables liés à ces thérapies¹⁷⁷. Il en découle une observance variant de 16 à 100 %²⁰² et difficilement prévisible. L'étude ADAGIO pour l'imatinib décrit une non adhérence au traitement, inattendue et élevée, d'environ 30 % associée à une réponse moindre chez les patients traités pour des GIST ou leucémies myéloïdes chroniques^{203,204}.

De la même manière, une variabilité de l'observance pourrait être en partie responsable de la variabilité interindividuelle de réponse observée avec le sunitinib. Cependant, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature.

1.2.8.2 Résistance au sunitinib

Le taux de réponse initiale au sunitinib est estimé à 30 %. De plus, la maladie progresse après 6 à 15 mois de traitement par sunitinib ¹⁶³ soulevant l'existence de résistances primaires et secondaires. Les mécanismes de résistance au sunitinib ne sont pas complètement élucidés. Plusieurs mécanismes ont été évoqués : up-régulation des voies de signalisation pro-angiogéniques, résistance *via* le microenvironnement tumoral, activation de voie de signalisation alternative ou inhibition inadéquate de la cible sont les principaux.

Le premier grand type de mécanisme concerne la restauration de l'angiogenèse. Il s'agit de la surexpression de facteurs pro-angiogéniques (PlGF, FGF, IL-8) ²⁰⁵⁻²⁰⁷ faisant suite à l'hypoxie tumorale induite par le traitement antiangiogénique. Cette hypoxie entraîne, comme décrit précédemment, l'accumulation d'HIF α conduisant à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, dans un modèle murin de carcinome pancréatique, la résistance aux antiangiogéniques était associée à une augmentation des facteurs pro-angiogéniques, dont le FGF. L'utilisation d'un FGF-trap permettait à nouveau de ralentir la croissance tumorale et l'angiogenèse. *In vitro*, le FGF2 stimulait la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubules malgré la présence de sunitinib ²⁰⁶. Au niveau clinique, une forte proportion de carcinomes rénaux exprimait fortement le FGF2, soulignant son rôle potentiel dans la résistance au sunitinib.

La résistance au sunitinib pourrait également être induite par le microenvironnement tumoral : les fibroblastes associés aux tumeurs (TAF), les *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) ou les péricytes. En effet, les TAF contribuent à la croissance tumorale et à l'angiogenèse en sécrétant notamment des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones comme HGF, EGF, SDF-1 ou IL-6 ²⁰⁸. Par ailleurs, les MDSC (population hétérogène de cellules myéloïdes immatures qui ont été définies comme CD11b+Gr1+ chez la souris) peuvent induire l'angiogenèse par deux mécanismes distincts. Elles entraînent un relargage de VEGF par la matrice extra cellulaire en produisant des taux élevés de MMP-9 ²⁰⁹. De plus, ces cellules peuvent se différencier en cellules endothéliales afin de former de nouveaux vaisseaux. Il a été démontré, au sein de tumeurs résistantes aux thérapies antiangiogéniques, une plus forte expression des gènes de cytokines impliquées dans la mobilisation et le recrutement de ces cellules MDSC, notamment le G-CSF ²⁰⁹.

Enfin, les péricytes pourraient également contribuer directement à la formation de vaisseaux sanguins en favorisant la survie des cellules endothéliales via PDGF²¹⁰.

D'autres mécanismes de résistance au sunitinib ont été évoqués tels que l'activation de voie de signalisation alternative, Gao *et al.* ont ainsi observé une activation de sphingosine kinase 1 (SK1) et ERK dans des lignées cellulaires de carcinome rénal résistantes au sunitinib. L'utilisation d'inhibiteurs de SK1 et ERK permet alors de restituer la sensibilité au sunitinib²¹¹.

Une inhibition inadéquate de la cible liée à des polymorphismes génétiques ou à une séquestration lysosomale du sunitinib a également été envisagée comme mécanisme potentiel de résistance au sunitinib. Les *single nucleotide polymorphism* (SNPs) de gènes qui régulent la pharmacodynamie du sunitinib (VEGFR et PDGFR) pourraient effectivement être impliqués dans la résistance au sunitinib. De façon intéressante, les SNPs rs307826 et rs307821 du VEGFR3 étaient associés à une diminution de la survie dans 2 études indépendantes^{212,213}.

Enfin, comme l'augmentation de l'efflux du médicament est un mécanisme classique de résistance, les concentrations intracellulaires de sunitinib dans des lignées de carcinome rénal et de colon ont été déterminées²¹⁴. De façon étonnante, la concentration intracellulaire de sunitinib était 10 fois supérieure dans les cellules résistantes au sunitinib comparées aux cellules sensibles. La microscopie à fluorescence a permis d'observer une augmentation de la séquestration lysosomale du sunitinib dans les cellules résistantes au sunitinib. Cette séquestration lysosomale serait réversible, supportant ainsi l'intérêt en clinique d'un *rechallenge* par sunitinib chez des patients qui progressent après un premier traitement par ce médicament.

1.2.9 Suivi thérapeutique pharmacologique

L'existence d'une relation PK/PD, d'un faible index thérapeutique, d'une large variabilité interindividuelle de l'exposition plasmatique au sunitinib et à son métabolite SU12662 associée à une faible variabilité intraindividuelle sont des arguments en faveur du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) du sunitinib. Un panel européen d'experts a récemment pris position en faveur de la réalisation du STP pour optimiser la prise en charge individuelle de leurs patients sous sunitinib¹⁹⁰. La fourchette thérapeutique proposée pour le STP est une concentration résiduelle composite située entre 50 et 100 ng/mL. Dans un contexte de médecine personnalisée, les objectifs de ce suivi sont d'une part, de diminuer les taux d'échecs thérapeutiques liés à une exposition plasmatique subthérapeutique, d'autre part de réduire la fréquence et la sévérité des effets indésirables liés à une surexposition plasmatique. De plus, le STP est également utile pour

le contrôle de l'observance des patients et l'identification d'interactions de type pharmacocinétique. A ce jour, il n'existe pas de preuve formelle de l'intérêt du STP en routine même si une étude pilote récente tend à montrer les bénéfices apportés par le STP ²¹⁵.

Cependant, la concentration plasmatique composite du sunitinib et de son métabolite actif n'est pas toujours le juste reflet de l'effet du médicament sur la cible. En effet, les protéines d'efflux PgP et BCRP sont également exprimées au sein de la cellule tumorale ²¹⁶. Par conséquent, leur niveau d'expression ou de fonctionnalité lié à la présence de polymorphismes génétiques peuvent altérer la diffusion intracellulaire du sunitinib et du SU12662, ce qui peut résulter en une inefficacité du médicament ou une toxicité importante au sein des cellules saines. Dans ce contexte, la pharmacogénétique peut être utile pour identifier ces facteurs, mais cette dernière doit être couplée à la recherche de biomarqueurs tumoraux de réponse et/ou de toxicité.

1.2.10 Biomarqueurs et sunitinib

Comme décrit précédemment, un sous-groupe de patients est résistant intrinsèquement ou développe des résistances sous traitement par sunitinib. Des marqueurs identifiant ces patients aideront à optimiser la prise en charge de la maladie.

Différents effets indésirables induits par le sunitinib tels que l'hypertension ^{217,218}, la leucopénie ^{218,219}, le syndrome main-pied ²²⁰ ou encore la thrombocytopénie ²²¹ ont été suggérés comme des marqueurs cliniques potentiels de réponse au traitement. En revanche, il n'existe pas actuellement de marqueurs cliniques validés par la communauté scientifique pouvant prédire la réponse clinique au sunitinib.

Différentes équipes ont essayé d'identifier des biomarqueurs circulants d'efficacité du sunitinib, tels que les cellules endothéliales circulantes (CEC). Comme les CECs sont relarguées dans la circulation suite aux dommages vasculaires, elles pourraient représenter un marqueur d'efficacité des traitements antiangiogéniques ²²². En effet, chez des patients atteints de CCR métastatique, un niveau de CECs augmenté durant le traitement par sunitinib était associé à une survie sans progression plus longue, comparée aux patients avec une diminution du nombre de CECs. Les CECs pourraient donc potentiellement être utilisées comme biomarqueur de réponse au traitement par sunitinib ²²³. Afin de prédire l'efficacité du sunitinib, de nombreuses études ont ciblé les ligands solubles des récepteurs au VEGF (VEGF-A, VEGF-C, PlGF) et les récepteurs solubles (sVEGFR-1/2/3) ²²⁴⁻²²⁶ ou encore des cytokines (IL-8, TNF α , MMP-9) ²²⁶ mais les résultats restent contradictoires dans la littérature.

Les progrès technologiques de ces dernières années, notamment la génomique et la méthylomique, ont également permis la mise en évidence de potentiels marqueurs génétiques ou épigénétiques. Ainsi, certains polymorphismes nucléotidiques de gènes (*VEGF-A*, *VEGFR*, *ABCB1*, *CYP3A5*) impliqués dans la régulation pharmacocinétique et pharmacodynamique du sunitinib sont corrélés à la survie sans progression ou la survie globale ²²⁶. De même, il a été suggéré que le degré de méthylation de promoteurs de certains gènes pouvait permettre de prédire la réponse au sunitinib. Ainsi, les patients atteints de CCR présentant une hyperméthylation du promoteur de *NEFH* (*Neurofilament heavy polypeptide*) avaient une survie globale de 9,8 mois *versus* 29,8 pour les patients avec une faible méthylation ($p=0,028$) ²²⁷. De même une faible méthylation des promoteurs de *CST6* (*cystatin E/M*) et *LAD1* (*ladinin 1*) était associée à une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale ²²¹. Toutefois, le nombre de patients de ces études était faible et une validation supplémentaire de la méthylation de promoteurs de *NEFH*, *CST6* et *LAD1* comme biomarqueur prédictif de la réponse aux ITK anti-VEGFR est nécessaire.

Enfin, des études récentes ont dressé des profils d'expression différents des micro-ARN (miRNA) chez les patients atteints de CCR traités par sunitinib. Les micro-ARN sont des ARN non codants qui contrôlent l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel. Une des études visant à montrer l'effet des miRNA dans la résistance au sunitinib a déterminé l'expression des miRNA au niveau du sang périphérique de patients atteints de CCR traités par sunitinib. La comparaison des mauvais répondeurs (SSP<6mois) *versus* bons répondeurs (SSP>18mois) a révélé une différence significative dans l'expression de 28 miRNA ²²⁸. Ainsi plus spécifiquement, Prior *et al.* ont observé une expression élevée de miR-942, -628-5p, -133a et -484, associée à une diminution du temps à progression et de la survie globale chez les patients atteints de CCRm. Une surexpression de miR-942 était le meilleur marqueur prédictif de l'efficacité du sunitinib chez les patients atteints de CCR ²²⁹. Le potentiel des miRNA comme biomarqueur prédictif de l'efficacité du sunitinib mérite donc d'être confirmé.

Malgré les nombreux travaux effectués, aucun biomarqueur prédictif de la réponse au sunitinib n'a été validé chez les patients atteints d'un carcinome rénal. En effet, la plupart des études ont été menées sur un faible nombre de patients et n'ont pas été construites avec un bras contrôle. Une validation sur de plus grandes cohortes de patients et des études prospectives est donc nécessaire afin de pouvoir valider ces potentiels marqueurs prédictifs, en vue d'une pratique clinique.

2 Le nivolumab chez les patients atteints de cancer bronchique non-à petites cellules

2.1 Généralités sur le cancer bronchique non-à petites cellules

2.1.1 Epidémiologie

Le cancer broncho-pulmonaire est le 2^{ème} cancer le plus répandu et est le cancer le plus mortel dans le monde ²³⁰. La survie globale à 5 ans est estimée à 16 % ²³¹. En France, il se situe au 4^{ème} rang des cancers et au 1^{er} rang des décès par cancer, tout sexe confondu. En effet, l'institut national de veille sanitaire (InVS) a estimé 39495 nouveaux cas ainsi que 29949 décès en 2012, dont 71 % survenant chez l'homme. Bien que l'incidence du cancer du poumon soit stable chez l'homme, elle est en forte augmentation chez la femme depuis 1980 avec un taux d'incidence standardisé de 5,3 % par an. L'âge moyen du diagnostic est de 65 ans chez la femme et 66 ans chez l'homme ¹⁴⁶. Le tabagisme (actif ou passif) représente le principal facteur de risque de cette pathologie. Plusieurs autres facteurs environnementaux ou professionnels sont reconnus comme cancérogènes, tels que l'amiante, l'arsenic, le radon ou les hydrocarbures polycycliques aromatiques ²³². Enfin, la pollution atmosphérique a récemment été identifiée comme facteur de risque ²³³.

2.1.2 Types histologiques

Deux grands types de carcinomes pulmonaires sont distingués à ce jour : les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC) (15 %) et les cancers bronco-pulmonaires non-à petites cellules (CBNPC) (85-90 %) ²³⁴. Il existe différents sous-types histologiques de CBNPC dont les plus fréquents sont ²³⁵:

- l'adénocarcinome (~43 %),
- le carcinome épidermoïde (~23 %),
- le carcinome à grandes cellules (~2 %).

La récente classification histologique des cancers broncho-pulmonaires élaborée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) décrit un grand nombre de sous-types, mettant en évidence le caractère hétérogène de cette pathologie ²³⁶.

2.1.3 Anomalies moléculaires

Différentes altérations génétiques ont été identifiées dans certains sous-types de CBNPC. Parmi elles, les deux altérations les plus importantes sont : la mutation activatrice du gène codant le récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGFR) ainsi que le réarrangement du gène *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*).

La mutation de l'EGFR et le réarrangement de *ALK* sont respectivement présents dans 30 % ²³⁷ et 2-8 % ²³⁸ des patients. Ces anomalies moléculaires sont plus fréquentes chez les patients n'ayant jamais fumés et dans les adénocarcinomes. La mutation de l'EGFR est également plus fréquemment retrouvée chez les femmes, alors que le réarrangement de *ALK* a tendance à être plus observé chez les patients jeunes.

2.1.3.1 Mutation de l'EGFR

Les mutations du gène de l'EGFR sont trouvées au sein des exons 18 à 21 ²³⁹. La délétion de l'exon 19 et la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représente 85 % des mutations de l'EGFR et entraîne une activation constitutive du récepteur à l'EGF. Ceci a pour conséquence, l'activation de différentes voies de signalisations telles que la voie des MAP kinases (RAS/RAF/MEK) qui sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire ; ou encore les voies JAK/STAT et PI3K/Akt/mTOR qui jouent un rôle dans l'inhibition de l'apoptose (Figure 21) ¹⁶⁴. L'activation de ce récepteur est donc double, avec une balance plutôt en faveur de la prolifération cellulaire ²⁴⁰.

Les cellules ayant ce type de mutation présente une addiction oncogénique vis-à-vis de l'EGFR, faisant des molécules inhibitrices de l'EGFR, des thérapies de choix pour la prise en charge des CBNPC exprimant une telle anomalie moléculaire. Toutefois, il est important de souligner que ces tumeurs peuvent également présenter une résistance secondaire au traitement, avec dans 50-60 % des cas une résistance liée à la mutation T790M de l'exon 20 ^{241,242}. L'amplification de Met est un autre mécanisme d'échappement au traitement retrouvé dans 20 % des cas de résistance secondaire, cependant dans 50 % des cas, la mutation T790M de l'exon 20 coexiste ²⁴³. Enfin, d'autres mutations secondaires telles que D761Y, L747S et T854A peuvent être retrouvées mais de façon beaucoup plus rare ²⁴⁴.

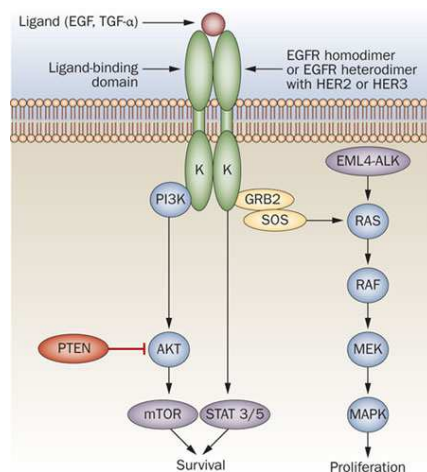


Figure 21 : Voies de signalisation de l'EGFR, d'après ²⁴⁵.

EGF, epidermal growth factor; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; K, kinase domain; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog; SOS, son of sevenless; STAT, signal transducer and activator of transcription; TGF-α, transforming growth factor alpha

2.1.3.2 Réarrangement de ALK

Dans le CBNPC, le remaniement de ALK le plus fréquent résulte de la translocation entre les gènes ALK et EML4 (*Echinoderm Microtubule associated protein Like 4*) sur le chromosome 2, aboutissant à la formation du gène de fusion EML4-ALK. Cette anomalie est responsable d'une activation constitutive de la cascade de signalisation des MAP kinases, entraînant la prolifération cellulaire (Figure 21) ²⁴⁶. De la même manière que pour les mutations de l'EGFR, des thérapies ciblant spécifiquement ALK peuvent être utilisées (crizotinib, Xalkori[®] ou céritinib, Zykadia[®])

2.1.3.3 Autres mutations

On retrouve des fusions de ROS1 dans environ 2 % des cancers du poumon ²⁴⁷. De même que pour les fusions ALK, les fusions ROS1 sont plus souvent trouvées chez les fumeurs légers et/ou les non-fumeurs.

Il existe des mutations du gène KRAS, retrouvées dans près de 25 % des cas de cancers du poumon ²⁴⁸. Ces mutations sont associées au statut tabagique (5 fois plus présentes chez les fumeurs). Des mutations BRAFV600E sont détectées dans moins de 2 % des CBNPC. Des mutations HER2 sont également retrouvées dans environ 2 % des cas. Une amplification de MET est retrouvée dans moins de 1 % et un réarrangement de RET est observé dans 1 à 2 % des adénocarcinomes ²⁴⁹. D'autres altérations sont en cours d'identification et pourraient à leur tour représenter des cibles thérapeutiques potentielles

2.1.3.4 *Recommandations*

La recherche d'une mutation du gène de l'EGFR ou un réarrangement du gène ALK doit systématiquement être demandée :

- en cas de cancer non-épidermoïde de stade avancé ou métastatique ;
- en cas de cancer épidermoïde chez des non-fumeurs de stade avancé ou métastatique.

En revanche, la recherche systématique d'altérations moléculaires des gènes KRAS, BRAF, HER2, ROS1 ou encore RET est en cours d'évaluation et donc n'est actuellement pas systématiquement recommandée ⁸¹.

2.1.4 **Prise en charge thérapeutique**

Les modalités de prise en charge thérapeutique, présentées dans la Figure 23, tiennent compte de différents facteurs tels que l'âge, l'état général, les comorbidités du patient, le stade TNM, l'histologie et les anomalies moléculaires de la tumeur que nous venons de décrire.

Le stade du cancer broncho-pulmonaire est évalué selon la classification TNM 7^{ème} édition de *l'American Joint Committee on Cancer* (AJCC) et de l'UICC ²³⁶.

2.1.4.1 *Stades précoces ou localement avancés*

Le CBNPC est peu sensible aux chimiothérapies ainsi qu'à la radiothérapie. Les stades précoces ou localement avancés de la maladie sont donc préférentiellement traités par une chirurgie toujours accompagnée d'un curage ganglionnaire. Un traitement adjuvant par radio et/ou chimiothérapie est souvent mis en place. La chimiothérapie est préconisée 4 à 8 semaines après l'intervention, avec 4 cycles d'une bithérapie associant du cisplatine et de la vinorelbine suivant un schéma d'administration de 21 jours.

Lorsque la chimiothérapie est administrée de façon concomitante ou séquentielle à la radiothérapie, la chimiothérapie est alors composée d'un sel de platine associé à une autre molécule (la vinorelbine, l'étoposide ou le paclitaxel) pendant 2 à 4 cures ²⁵⁰.

2.1.4.2 *Stades métastatiques*

On estime qu'au moment du diagnostic 40 à 55 % des CBNPC sont à un stade métastatique ²⁵¹ et que 15-20 % le deviendront par la suite ²⁵². Durant les dernières décennies, la découverte de l'hétérogénéité moléculaire du CBNPC a radicalement modifié le diagnostic de cette pathologie et

par conséquent les stratégies thérapeutiques. La prise en charge du cancer métastatique repose uniquement sur l'utilisation de thérapies systémiques telles que la chimiothérapie, les thérapies ciblées et plus récemment l'immunothérapie.

❖ La chimiothérapie

La chimiothérapie est indiquée en première intention. L'utilisation d'un sel de platine associé à une autre molécule de 3^{ème} génération (la vinorelbine, l'étoposide, la gemcitabine, le pemetrexed ou le paclitaxel) pour 4 à 6 cycles, permet d'augmenter significativement la survie globale²⁵³⁻²⁵⁵. Une chimiothérapie de seconde ligne ou de ligne ultérieure est recommandée, que le patient ait répondu ou non à la première ligne de traitement métastatique. Le traitement dépendra des molécules utilisées lors des cures précédentes.

❖ Les thérapies ciblées

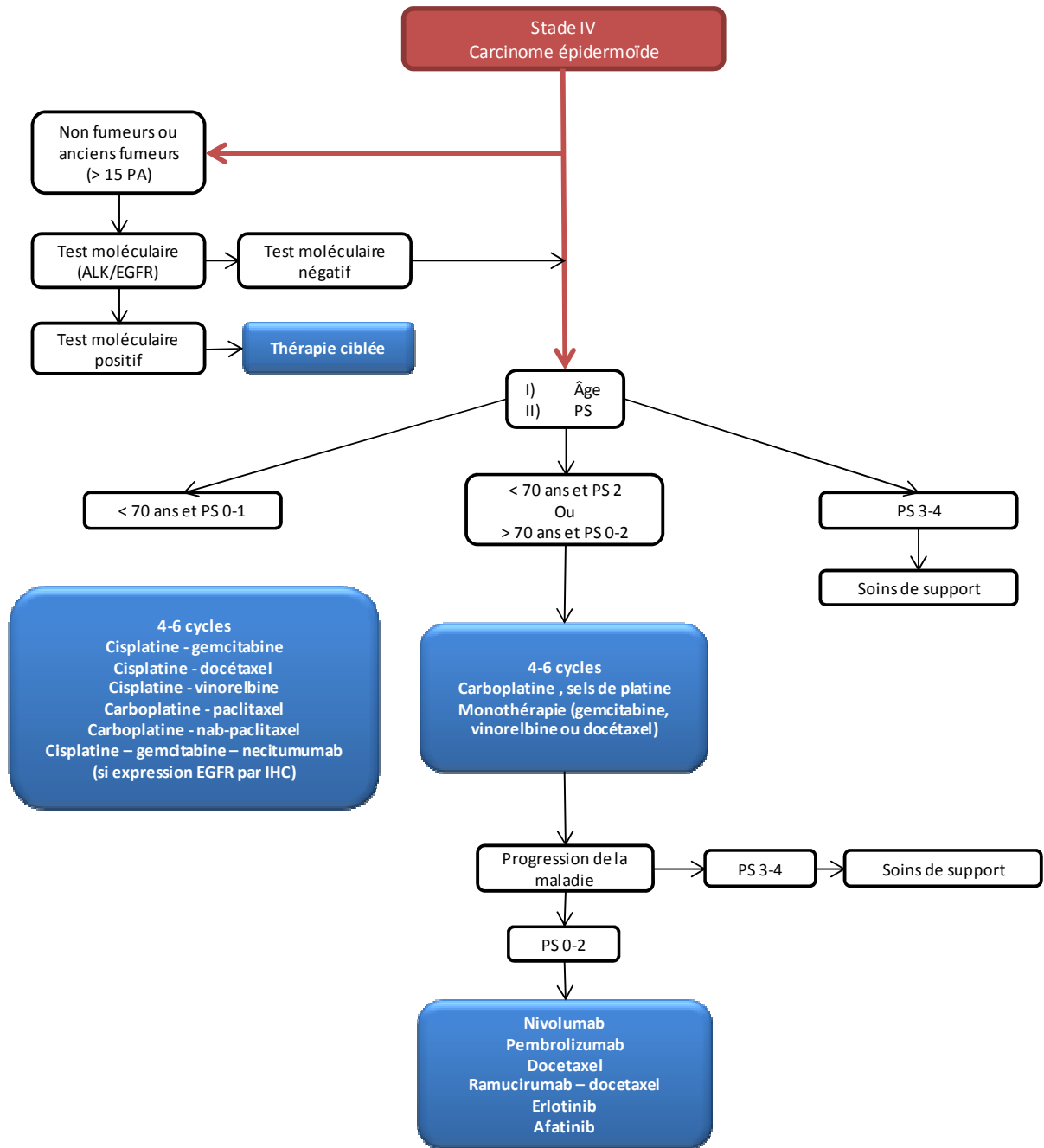
L'association du bevacizumab (Avastin[®]), anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A circulant, en association à une chimiothérapie améliore le taux de réponse, la survie sans progression ainsi que la survie globale chez certains patients par rapport à l'utilisation de la chimiothérapie en monothérapie.

Ces dernières années, la mise en évidence de certaines anomalies moléculaires au sein de la tumeur a permis l'émergence des thérapies ciblées. Pour les tumeurs présentant une mutation activatrice de l'EGFR, il est recommandé d'utiliser en première ligne un inhibiteur de tyrosine kinase en monothérapie tel que l'erlotinib (Tarceva[®]), le gefitinib (Iressa[®]) ou l'afatinib (Giotrif[®]). En effet, ces molécules ont montré une efficacité supérieure à la chimiothérapie en première ligne en termes de taux de réponse et de survie sans progression, tout en améliorant la qualité de vie des patients²⁵⁶⁻²⁵⁹. Chez les patients qui développent la mutation de résistance de l'EGFR T790M, l'osimertinib (Tagrisso[®]), un inhibiteur de 3^e génération de l'EGFR actif contre cette mutation devient le traitement de référence dans cette situation. Les inhibiteurs de ALK tels que le crizotinib (Xalkori[®]) et le ceritinib (Zykadia[®]) peuvent être utilisés en première et deuxième ligne, respectivement dans les CBNPC ayant un réarrangement de ALK.

❖ L'immunothérapie

Récemment, de nouvelles molécules immuno-modulatrices ont été développées. Ces thérapies ciblent les « *immune checkpoints* », ce qui a pour but de stimuler le système immunitaire de l'hôte et d'augmenter la réponse contre les cellules tumorales. Le premier type d'immunothérapie développé a été un anticorps anti-CTLA4, l'ipilimumab (Yervoy[®]). Mais pour les patients atteints

de CBNPC, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des inhibiteurs du PD-1/PD-L1 qui ont probablement une activité supérieure dans les tumeurs avec haut taux de mutation ²⁶⁰. De plus, dans les CBNPC une surexpression du PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8 circulants et infiltrants la tumeur a été observée ²⁶¹. Le nivolumab (Opdivo[®]) est ainsi préconisé en Europe en deuxième ligne chez les patients ayant progressé sous chimiothérapie. Par ailleurs, le pembrolizumab (Keytruda[®]) qui cible également le récepteur PD-1, est indiqué aux Etats-Unis dans le CBNPC après échec d'une première ligne de traitement.



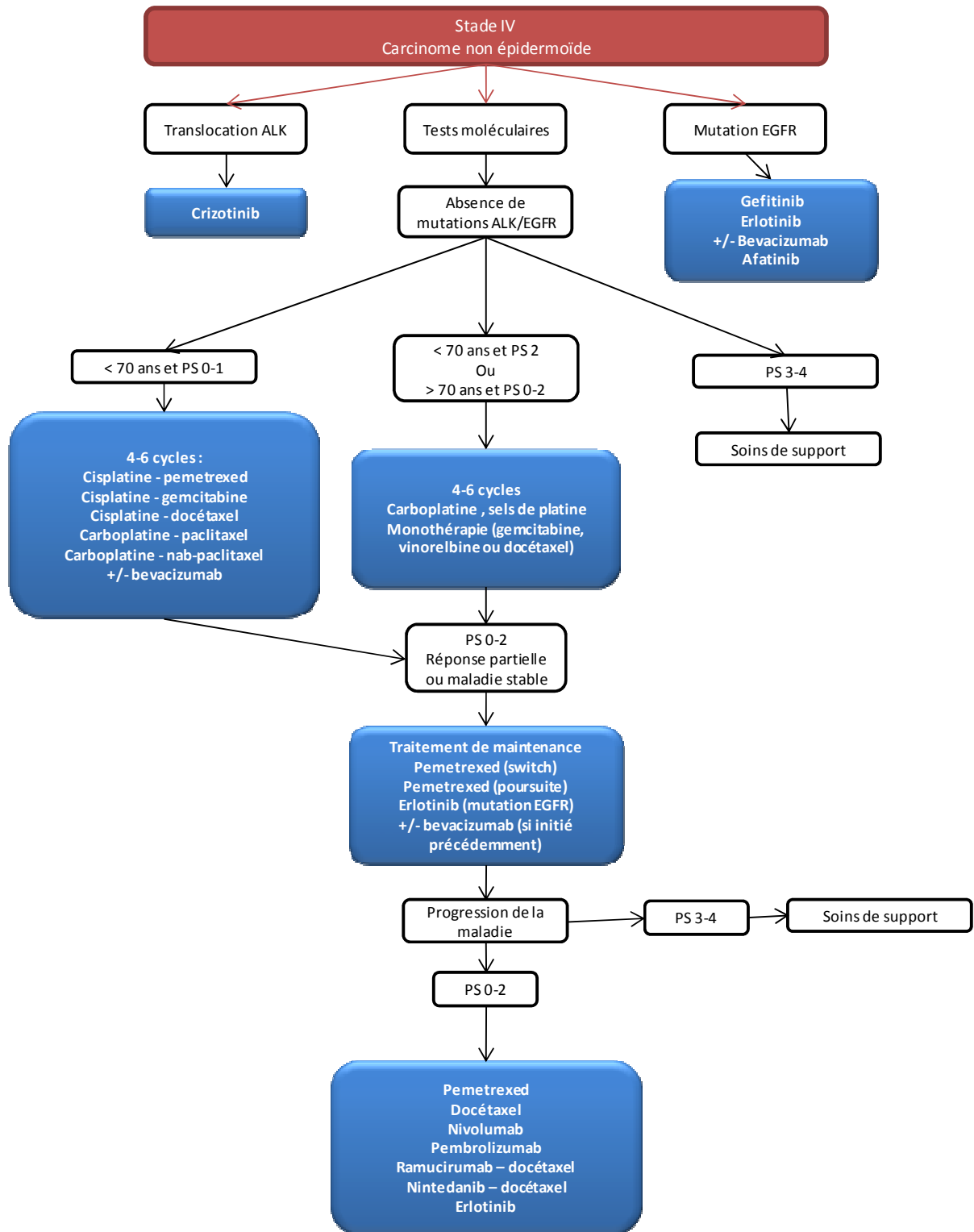


Figure 22 : Stratégies de prise en charge en première ligne des CBNPC épidermoïdes et non-épidermoïdes. D'après ⁸¹.

ALK : anaplastic lymphoma kinase ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; IHC : immunohistochimie ; nab: nanoparticle albumin-bound ; PA : paquet/année ; PS : performance status.

2.2 Le nivolumab

2.2.1 Structure

Le nivolumab est un anticorps monoclonal humanisé de type immunoglobuline G4 (IgG4) composé de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères. Cet anticorps est obtenu à partir de souris transgéniques immunisées. Son fragment Fc (fragment cristallisable) a été modifié dans le but d'éviter la cytotoxicité dépendante des anticorps (*ADCC Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*).

2.2.2 Activité pharmacologique

Le nivolumab se lie spécifiquement au récepteur PD-1 et possède une grande affinité pour celui-ci. La fixation du nivolumab sur le PD-1 empêche ainsi l'interaction avec ses 2 ligands PD-L1 et PD-L2. Ceci a pour conséquence une levée de l'inhibition des lymphocytes qui rétablit et amplifie la réponse immunitaire anti-tumorale ²⁶².

Le nivolumab se fixe avec une grande affinité au PD-1 des lymphocytes T effecteurs à mémoire, et des lymphocytes Treg. En revanche, le nivolumab ne se fixe ni sur les CD4 naïfs ni les CD8 naïfs ²⁶³, ce qui montre que le PD-1 est surexprimé chez les cellules T activées dans les tissus périphériques.

Lors des essais pré-cliniques cellulaires, la concentration efficace 50 % du nivolumab sur le PD-1 de lymphocytes T CD4 activés était de 0,64 nmol/L et les concentrations nécessaires pour inhiber 50 % de l'interaction du PD-1 avec les ligands PD-L1 et PD-L2 étaient respectivement 2,52 et 2,59 nmol/L. Cette forte affinité a été confirmée lors d'un essai de Phase I qui a montré que le taux d'occupation des récepteurs PD-1 des lymphocytes T circulants par le nivolumab était indépendant de la dose ²⁶³. Le pic moyen d'occupation était de 85 % (bornes 70-97 %) et le taux moyen d'occupation de 72 % (extrêmes 59-81 %). L'occupation du récepteur par le nivolumab pouvait être détectée dès la 4^{ème} heure après la première perfusion et jusqu'à 57 jours après la perfusion ²⁶². Enfin, le récepteur pouvait être encore occupé par le nivolumab alors que ce dernier était indétectable dans le sérum (<1,25 µg/mL) ²⁶².

2.2.3 Indications

Depuis 2014, le nivolumab a obtenu une AMM dans différentes indications à la posologie de 3 mg/kg toutes les 2 semaines.

Il a été initialement approuvé par la FDA en décembre 2014 puis par l'EMA en avril 2015 en première ligne du traitement du mélanome avancé ou métastatique, suite aux résultats de l'essai de Phase III le comparant en monothérapie à la dacarbazine²⁶⁴. Il a été par la suite respectivement approuvé par la FDA et l'EMA en mars et juillet 2015, pour le traitement du CBNPC métastatique de type épidermoïde chez des patients ayant préalablement reçu une première ligne de traitement, en association. Cette autorisation a depuis été étendue par la FDA aux CBNPC non épidermoïdes. Ceci fait suite aux essais de Phase III Checkmate 057 et 017, qui ont comparé le nivolumab en monothérapie au docétaxel dans le traitement des CBNPC non épidermoïdes et épidermoïdes^{265,266}.

Depuis novembre 2015, il est autorisé par la FDA pour le traitement en 2^{ème} ligne du cancer du rein métastatique chez les patients préalablement traités par une thérapie antiangiogénique, suite à l'essai de Phase III le comparant en monothérapie à l'évérolimus¹⁶⁹. En Europe, un avis favorable de l'EMA pour l'extension de l'autorisation au cancer du rein et au cancer bronchique non épidermoïde a été prononcé en février 2016.

Depuis avril 2016, le nivolumab est indiqué en association avec l'ipilimumab dans le mélanome avancé selon la posologie suivante : 1 mg/kg de nivolumab en association avec l'ipilimumab (3 mg/kg) toutes les 3 semaines pour 4 cycles, suivi d'une monothérapie par nivolumab à 3 mg/kg toutes les 2 semaines.

Enfin, le nivolumab est en cours d'évaluation dans d'autres indications avec des taux de réponse objective de 19% dans un essai de Phase I/II dans le carcinome hépatocellulaire²⁶⁷, de 17% dans un essai de Phase II dans le cancer de l'ovaire²⁶⁸ et de 18% dans une Phase I/II dans le cancer bronchique à petites cellules²⁶⁹.

2.2.4 Propriétés pharmacocinétiques

Le nivolumab est administré en perfusion intraveineuse sur une période de 60 minutes, toutes les 2 semaines à la posologie de 3 mg/kg.

La pharmacocinétique du nivolumab est linéaire pour des posologies allant de 0,1 à 10 mg/kg. En effet, la concentration au pic (C_{max}) ainsi que l'ASC évoluent proportionnellement à la dose avec une variabilité interindividuelle modérée (30-50 %). La C_{max} est atteinte dans les 4 heures après

le début de la perfusion ²⁶². La distribution du nivolumab se fait selon un modèle bi-compartimental avec une élimination d'ordre 1. Le volume de distribution est de 8 litres. Une approche de pharmacocinétique de population à partir de données (n=1314 dosages) d'essais de Phase I (n=3), de Phase II (n=3) et de Phase III (n=3) a permis de déterminer à l'état d'équilibre la moyenne géométrique de la clairance ainsi que l'ASC : 92 mL/h et 75,3 µg/mL.h⁻¹ ²⁷⁰. La clairance du nivolumab augmente avec le poids corporel. Cependant, l'administration d'une dose normalisée en fonction du poids permet d'uniformiser les Cmin à l'état d'équilibre. Le nivolumab étant un anticorps monoclonal de type IgG4 entièrement humain, sa métabolisation ne passe pas par les cytochromes P450 (CYP450) ou autre enzymes métabolisant les médicaments. Son métabolisme est probablement identique à celui des IgG endogènes. Le nivolumab serait donc dégradé, par diverses voies cataboliques, en acides aminés et en peptides de petites tailles. L'administration concomitante de médicaments inhibiteur ou inducteur enzymatique ne devrait donc pas entraîner de modification de l'exposition plasmatique au nivolumab. Dans ce contexte, aucune étude d'interaction de type pharmacocinétique n'a été réalisée avec le nivolumab. Lors d'un essai de Phase I ²⁶², la demi-vie du nivolumab dans le sérum a été estimée entre 12 (0,3 ; 1 ou 3 mg/kg) et 20 jours (10 mg/kg). L'approche de population a estimée la demi-vie à 26 jours ²⁷⁰, ce qui est cohérent avec la demi-vie d'élimination des IgG4 endogènes dont la demi-vie terminale est de l'ordre de 27 jours.

Tableau 9 : Paramètres pharmacocinétiques du nivolumab déterminés par une approche de pharmacocinétique de population ²⁷⁰.

Paramètres	Valeur estimée (CV)
CL (mL/h)	92 (48%)
Vd (L)	7,7 (29,5%)
t1/2 (jours)	26 (87 %)
ASC _{ss} (µg/mL.h ⁻¹)	78,0 (27,8 %)

ASC_{ss}, aire sous la courbe à l'état d'équilibre (ss : steady state) ; CL, clairance ; CV, coefficient de variation ; Vd, volume de distribution

La clairance du nivolumab présente une variabilité interindividuelle de 50 %. L'analyse de population a permis de montrer que l'albuminémie pouvait influencer de manière significative la clairance du nivolumab. Ainsi, une diminution de 29,8 % de la clairance a été observée chez les patients ayant une albuminémie de 30 g/L en comparaison aux patients ayant une albuminémie de 40 g/L. Le poids total a également été identifié comme une covariable influençant significativement la clairance au nivolumab. Cependant, la posologie en mg/kg permet de lisser cette influence puisqu'une exposition similaire a été observée chez des patients ayant un poids

compris entre 34 et 162 kg. Enfin, l'âge, le sexe, la race, l'ECOG, le type et la taille de tumeur, l'insuffisance hépatique et le taux de filtration glomérulaire estimé n'ont pas d'effets cliniquement pertinents sur la clairance du nivolumab.

Enfin, il existe une variabilité interindividuelle modérée d'exposition sérique (C_{max} et ASC) au nivolumab, de l'ordre de 30 %²⁷⁰.

2.2.5 Efficacité Clinique dans le cancer du poumon

L'efficacité du nivolumab (3 mg/kg toutes les 2 semaines) en seconde ligne de traitement dans les CBNPC épidermoïdes et non-épidermoïdes a été respectivement comparée à celle du docetaxel (75 mg/m² toutes les 3 semaines) lors des essais cliniques de Phase III CheckMate 017²⁶⁶ et 057²⁶⁵. Ces deux essais ont mis en évidence une amélioration significative du taux de réponse et de la survie globale (SG). Pour les patients présentant un CBNPC épidermoïde (n=272), la médiane de la SG était de 9,2 mois dans le bras nivolumab *versus* 6 mois avec le docetaxel (p<0,001) ; tandis que pour les cancers non-épidermoïdes (n=582) la SG était de 12,2 mois avec le nivolumab *versus* 9,4 mois avec le docetaxel (p<0,001). Le taux de réponse objective était statistiquement meilleur dans le bras nivolumab pour les types épidermoïdes (20 % *vs* 9 %, p=0,008) et non épidermoïdes (19 % *vs* 12 %, p=0,02).

Pour les types non-épidermoïdes, une meilleure SG a été rapportée au sein de la population présentant un statut PD-L1 positif (détection par immunohistochimie, IHC). En revanche, aucun bénéfice n'a été observé chez les patients ayant un statut PD-L1 négatif, non-fumeurs ou EGFR mutés.

Les résultats de ces études ont été récemment confirmés lors de l'essai CheckMate 153, toujours en cours, sur une large cohorte de patients (n=824) atteints de CBNPC. Parmi les 395 patients évaluable pour la réponse tumorale, une réponse partielle ou une maladie stabilisée ont été respectivement observées chez 14 % et 49 % des patients. Cependant, aucune différence de réponse n'a été mise en évidence en fonction du statut PD-L1 des patients ou de l'ECOG²⁷¹.

Plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité du nivolumab (en monothérapie ou en association) en première ligne dans le traitement du CBNPC²⁴⁹. Des résultats préliminaires d'un essai de Phase I (CheckMate 012) mené chez 52 patients atteints de CBNPC et traités en première ligne par nivolumab en monothérapie ont montré un taux de réponse objective de 21 %, associée à une longue durée de réponse (extrêmes 7,6-85,6 mois, et une médiane non encore

atteinte)²⁷². Enfin, un essai de Phase III (CheckMate 026) est actuellement en cours pour comparer l'efficacité en première ligne du nivolumab en monothérapie à une chimiothérapie (au choix de l'investigateur) chez des patients atteints d'un CBNPC et présentant un statut PD-L1 positif.

2.2.6 Toxicité

Le nivolumab présente un profil de tolérance acceptable. Lors des essais cliniques, l'état général des patients n'a pas semblé affecter la tolérance²⁷¹. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précautions puisque les patients inclus dans les essais cliniques sont sélectionnés et ne sont forcément représentatifs des patients de la population générale qui sont souvent plus fragiles (âge avancé, nombreuses comorbidités, sarcopénie...) et par conséquent présentent un risque accru de toxicités sévères (grades 3 ou 4).

Lors des essais cliniques, les effets indésirables du nivolumab étaient généralement moins sévères et fréquents que ceux induits par les chimiothérapies conventionnelles. Ainsi, les essais cliniques comparant le nivolumab au docetaxel ont rapporté une fréquence de toxicités de grades 3 ou 4 plus faible avec le nivolumab (7 à 10 % *vs* 54 à 55 %, respectivement). Lors de différents essais, 58 à 74 % des patients traités par nivolumab ont présenté des effets indésirables, tout grade confondu^{273,274}. Les toxicités les plus fréquentes étaient la fatigue, l'anorexie et l'asthénie. Aucune relation entre la dose ou la durée du traitement et la toxicité n'a été clairement démontrée. Par ailleurs, aucune dose maximale toxique n'a été clairement identifiée lors des essais de Phase I.

Le nivolumab possède des effets indésirables spécifiques appelés « *immune-related Adverse Events* » (irAE) liés à son mécanisme d'action. Ils apparaissent souvent de façon retardée par rapport à la mise en place du traitement. Des irAE ont été rapportés chez environ 50 % des patients atteints de CBNPC traités par nivolumab sur l'ensemble des essais cliniques. Les plus communs étaient une toxicité cutanée de type rash ou prurit (5 à 16 %), une diarrhée (8 à 12 %) et une pneumopathie immunologique (3 à 6 %) ^{273,275,276}. Ces irAE étaient généralement peu sévères et réversibles. D'autres irAE moins fréquents tels que les endocrinopathies représentées essentiellement par l'hypothyroïdie, les néphrotoxicités ou les cytolyses hépatiques ont été également rapportés ^{266,273,275,276}. Les délais d'apparition étaient très variables d'un patient à l'autre, allant de quelques jours à quelques mois ²⁴⁹. Ces toxicités pouvaient nécessiter l'arrêt temporaire ou définitif du nivolumab et l'administration de corticoïdes ou d'un anti-TNF (infiximab). La

pneumopathie immunonologique (1 à 3 % de grade 3-4) a été identifiée comme étant l'irAE le plus fréquemment responsable d'un arrêt du traitement. De plus, certains patients sont décédés suite à cette toxicité lors des essais de Phase I et II ^{273,274}.

2.2.7 Relation PK/PD

Très peu de données sont actuellement disponibles en ce qui concerne la relation entre la concentration sérique du nivolumab et la réponse, que ce soit en termes de toxicité ou d'efficacité. Les seules données actuellement disponibles pour la relation PK/PD proviennent du rapport d'évaluation du nivolumab remis à la FDA et l'EMA. Dans ce rapport, est spécifié que ni la concentration résiduelle sérique après la première administration ni celle à l'état d'équilibre n'est prédictive de la survie globale. De même, aucune relation n'est rapportée entre la survenue de toxicités sévères et l'exposition sérique au nivolumab ²⁷⁰. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés avec des données issues de patients classiques et non sélectionnés pour des études cliniques standardisées pour lesquels, comme nous l'avons déjà dit, une plus large variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique et de la réponse au traitement (efficacité, toxicité) est attendue.

2.2.8 Les enjeux du nivolumab

Le nivolumab représente donc une alternative aux chimiothérapies conventionnelles en seconde ligne dans les CBNPC. Néanmoins, un certain nombre de challenges persistent actuellement pour l'utilisation de cet inhibiteur des *checkpoints* immunitaires.

2.2.8.1 Evaluation de la réponse

L'évaluation de la réponse des patients traités par inhibiteur des *checkpoints* immunitaires présente des difficultés par rapport à celle de la chimiothérapie puisque la cinétique de réponse sous ces traitements peut être différente. Ainsi, des profils de réponse inhabituels ont été rapportés, sous forme de réponses retardées dites « pseudo-progression ». Elles se manifestent par l'augmentation initiale des lésions, voire une apparition de nouvelles lésions avant leur régression par la suite. Ce phénomène est lié à l'infiltrat inflammatoire présent au niveau tumoral qui peut augmenter sous l'effet du traitement. Sachant que l'évaluation radiologique actuelle (critères RECIST) est incapable de discriminer une « pseudo-progression » d'une réelle progression tumorale, il est

préconisé de continuer le traitement chez les patients considérés cliniquement stables²⁷⁷. Il arrive que ces pseudo-progressions surviennent plusieurs mois après l'initiation du traitement, rendant encore plus difficile la distinction avec une réelle progression tumorale. Bien que la plupart des essais aient utilisé les critères d'évaluation RECIST, de nouveaux critères d'évaluation de la réponse tumorale aux immunothérapies ont été proposés en 2009 afin de ne pas conclure à tort à une progression. Ces *immune-related response criteria* (irRC)²⁷⁷ permettent de considérer qu'un patient est répondeur lors de l'apparition d'une lésion, si les autres lésions présentes à l'initiation du traitement diminuent. Ces critères utilisent la somme des produits des plus grands diamètres perpendiculaires des lésions pour mesurer la masse tumorale à l'initiation du traitement. A chaque évaluation, la taille des nouvelles lésions est incorporée pour juger de l'évolution globale de la masse tumorale. Une réponse partielle est caractérisée par une diminution par rapport au *baseline* de plus de 50 % et une progression par une augmentation de la masse tumorale de plus de 25 %. Toute réponse doit être confirmée par une nouvelle évaluation à au moins 4 semaines d'intervalle.

2.2.8.2 Associations thérapeutiques

La tumeur utilise différents mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale. Le rationnel de combiner des immunothérapies agissant sur différentes cibles semblerait être une alternative pour prévenir la résistance tumorale. Les mécanismes immuno-régulateurs sont très complexes et hétérogènes en fonction des tumeurs et des individus. L'amélioration de la compréhension de ces mécanismes, pourrait permettre d'identifier des combinaisons thérapeutiques additives voire synergiques.

Les récepteurs PD-1 et CTLA-4 inhibent l'activité des LT lors de différentes phases de la réponse immunitaire et ce à travers différentes voies. Bloquer ces deux signaux est donc probablement redondant mais synergique, ou tout au moins additif. Dans ce sens, un essai clinique associant le nivolumab et l'ipilimumab (anti CTLA-4) a été mené chez des patients atteints de CBNPC. Des résultats intéressants ont été rapportés, avec un taux de réponse objective compris entre 13 et 39 %. Ce dernier était dépendant des schémas de doses d'immunothérapies administrées. En revanche, les toxicités étaient bien plus fréquentes qu'avec le nivolumab en monothérapie : 28 à 35 % de toxicités de grade 3-4²⁷⁵. L'objectif de cette étude était également de comparer les effets du nivolumab seul et en association avec une autre thérapie telle que la chimiothérapie à base de platine et les thérapies ciblées. Etant donné les résultats prometteurs de la combinaison nivolumab et ipilimumab dans le mélanome^{278,279}, une étude de Phase III a été initiée pour évaluer la SG des patients ayant un CBNPC traités par nivolumab ou nivolumab associé à

l'ipilimumab ou une chimiothérapie. Par ailleurs, une étude de Phase I est actuellement en cours pour comparer l'efficacité et le profil de tolérance du nivolumab en monothérapie et du nivolumab en association avec une autre thérapie (ipilimumab, chimiothérapie à base de platine ou thérapie ciblée) ²⁴⁹.

D'autres stratégies thérapeutiques pourraient être envisagées telles que l'association du nivolumab à des agonistes de molécules activatrices de LT (action sur la superfamille des récepteurs au TNF tel que OX40), afin de potentialiser la levée d'inhibition du système immunitaire. D'autres combinaisons avec d'autres molécules pourraient être évaluées:

- co-stimulations inhibitrices au niveau des lymphocytes telles que TIM3 (*T cell Ig and Mucin-3*) ou LAG3 (*Lymphocyte Activation Gene-3*) ²⁸⁰ ;
- voies immunosuppressives métaboliques avec l'IDO (Indoleamine 2,3 dioxygénase) ²⁸¹ ;
- cibles présentes sur les cellules immunosuppressives du microenvironnement, comme CSF1R (*Colony stimulating factor 1 receptor*) sur les cellules myéloïdes, ou KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*) sur les cellules NK ^{282,283}.

Un pré-traitement permettant de recruter des lymphocytes au niveau tumoral pourrait être un préalable nécessaire ^{284,285}, faisant envisager des associations avec un anti-CTLA4 pour rétablir le recrutement des LT au niveau tumoral ²⁸⁵, des cytotoxiques, des thérapies ciblées ou des rayonnements ionisants pour favoriser la libération d'antigènes tumoraux. Enfin, des stratégies de vaccination anti-tumorale ou de thérapie cellulaire par transfert de lymphocytes pourraient être également intéressantes pour induire ou reproduire une réponse immunitaire.

2.2.8.3 Facteurs prédictifs de la réponse

Les différents essais thérapeutiques chez des patients atteints de CBNPC traités par nivolumab ont rapporté des résultats prometteurs, avec un taux de réponse objective d'environ 20 %. Cependant, la majorité des patients ne répond pas et certains d'entre eux peuvent présenter des toxicités pouvant s'avérer irréversibles voire létales. Par conséquent, l'identification d'un biomarqueur permettant de prédire la réponse tumorale au traitement ou la survenue d'une toxicité sévère apparaît nécessaire. Un tel biomarqueur pourrait permettre de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ce traitement et de diminuer les coûts inutiles, sachant que le prix pour 12 semaines de thérapie est d'environ 36000 euros. Dans ce but, de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer d'éventuels biomarqueurs de réponse.

❖ Le statut PD-L1

Différents essais cliniques ont étudié par IHC l'expression du PD-L1, des cellules tumorales comme marqueur prédictif ou pronostique de la réponse au traitement. Cependant, les résultats rapportés actuellement dans la littérature sont discordants (Tableau 10).

L'essai de Phase I du nivolumab chez des patients atteints de tumeurs solides avancées suggère que le statut PD-L1 aurait un rôle prédictif de la réponse tumorale, avec 36 % de réponse chez les patients PD-L1 + *versus* aucune réponse chez les patients PD-L1 - ($p=0,006$)²⁸⁶. Cet essai de Phase I incluait des différents types tumoraux (mélanome, CBNPC, prostate, colon et rein). En revanche, aucune association n'a été observée entre le statut PD-L1 et la réponse au traitement ou la survie globale chez 68 patients préalablement traités pour CBNPC²⁷³. De plus, les données de Phase III montrent une efficacité du nivolumab indépendante du statut PD-L1 pour les sous-types épidermoïdes²⁶⁵. L'expression de PD-L1 semblerait toutefois être associée à la réponse, la SSP et la SG pour les carcinomes non-épidermoïdes²⁶⁶. De manière générale, lors des différents essais, une réponse objective ainsi qu'une plus longue durée de réponse ont été observées quel que soit le statut PD-L1, bien que cela soit plus souvent retrouvé chez les patients PD-L1 +^{272,274}. Enfin, une méta-analyse portant sur 20 essais cliniques, incluant des mélanomes, des CBNPC et des cancers génitaux, traités par anti-PD-1 ou anti-PDL1, a mis en évidence une association entre le taux de réponse tumorale et le statut PD-L1 avec 34,1 % de répondeurs parmi les patients PD-L1 + *versus* 19,9 % chez les patients PD-L1 - ($p<0,0001$). Concernant les CBNPC, le taux de réponse était plus important chez les patients PD-L1 + que chez les PD-L1 - , avec une différence absolue de 8,7 %²⁸⁷.

Toutefois, le seuil de positivité variait selon les essais et les techniques utilisées pour mesurer l'expression de PD-L1 n'étaient pas toujours similaires. Enfin, il est important de souligner qu'une proportion significative de patients avec un statut PD-L1 - répondait au nivolumab dans plusieurs essais.

Il semble donc difficile à ce jour d'identifier clairement les patients éligibles au traitement par nivolumab uniquement à partir du statut PD-L1, au risque d'exclure des patients potentiellement répondeurs à cette immunothérapie. Dans ce contexte, le statut PD-L1 n'est actuellement pas recommandé en pratique clinique comme biomarqueur prédictif ou pronostique au traitement par nivolumab.

Tableau 10 : Association du statut PD-L1 avec le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale dans les différents essais du nivolumab.

Référence	Phase	Tumeur	Seuil de positivité (% CT)	TR PD-L1+/- (%)	SSP PD-L1 +/- (mois)	SG PD-L1 +/- (mois)	Conclusion
Topalian et al ²⁸⁶	I	Mélanome, rein, colon, CBNPC, prostate	5	36 / 0 p= 0,006			Association significative
Gettinger et al ²⁷³	I	CBNPC	5	15 / 14	3,3 / 1,8	7,8 / 10,5	Pas d'association.
Rizvi et al ²⁷⁴	I	CBNPC	5*	24 / 14			Association.
Brahmer et al ²⁶⁵	III	CBNPC (CE)	5*	21 / 15 p=0,29	p=0,47	p=0,16	Pas d'association
Borghaei et al ²⁶⁶	III	CBNPC (ADK)	5*	36 / 10 p=0,002	5 / 2,1 p=0,0001	18 / 9,7 p=0,0004	Valeur prédictive quel que soit le seuil.

CT : cellules tumorales ;PD-L1 : *programmed death ligand 1* ; SG : survie globale ; SSP : survie sans progression ; * dans cette étude les seuils de 1 et 10 % ont également été utilisés. La valeur p est mentionnée quand elle est disponible. + :positif ; - : négatif.

❖ Les mutations somatiques

Selon de récentes données, la charge mutationnelle pourrait influencer la réponse aux inhibiteurs du PD-1. En effet, les tumeurs présentant le plus fort taux de mutations sont associées à une meilleure réponse aux immunothérapies. L'efficacité du nivolumab dépend de sa capacité à reconnaître les antigènes tumoraux présents à la surface des cellules tumorales. Les néo-antigènes, qui proviennent de mutations spécifiques de l'ADN tumoral, semblent jouer un rôle important dans le contrôle immunitaire de la tumeur ²⁸⁸. Il est ainsi attendu que le taux de néo-antigènes augmente avec la charge mutationnelle. Pour les CBNPC, les charges mutationnelles et les gènes affectés sont différents entre les patients fumeurs et non fumeurs ²⁸⁹. Les cancers du poumon induits chez les fumeurs présentent une charge mutationnelle plus importante ²⁹⁰⁻²⁹². Il a également été démontré que le pembrolizumab était plus efficace chez les patients avec une forte charge mutationnelle, en particulier chez les patients fumeurs ²⁸⁹.

Dernièrement il a été décrit qu'une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (« *mismatch-repair* ») était associé à un meilleur taux de réponse objective ainsi qu'une meilleure survie. Toutes ces données suggèrent que l'évaluation de la charge mutationnelle ou de la présence de néo-antigènes spécifiques, par séquençage de l'exome (*whole exome sequencing*), devrait être prochainement évaluée comme potentiel biomarqueur prédictif ^{96,260,293}.

❖ Les lymphocytes infiltrant la tumeur

Des alternatives au statut PD-L1 comme biomarqueur prédictif de la réponse tumorale ont été envisagées. Ainsi, Taube *et al.* ont montré chez 41 patients atteints d'une tumeur solide avancée que l'expression du PD-L1 était géographiquement associée à la présence de cellules immunitaires infiltrant la tumeur, bien que les régions riches en lymphocytes n'étaient pas tout le temps associées avec l'expression du PD-L1. L'expression de PD-L1 par la cellule tumorale et les infiltrats immunitaires était associée à l'expression du PD-1 par les lymphocytes. Cependant, seul le statut PD-L1 au niveau tumoral était associé significativement à la réponse au nivolumab ($p=0,025$)⁸⁹.

L'immuno-score, un biomarqueur composite de la progression naturelle de la tumeur, pourrait prédire la réponse au traitement. Il permet d'évaluer le type et la quantité de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) et ainsi de mieux comprendre le comportement tumoral²⁹⁴. L'immuno-score a été évalué dans le cancer colorectal où il a été montré que le taux de lymphocytes CD8 au niveau de la tumeur était un meilleur candidat pour identifier la récurrence que le score TNM²⁹⁵. Une harmonisation des techniques d'IHC, des types cellulaires pris en compte ainsi que la région étudiée est en cours dans le but d'établir un immuno-score qui pourrait être utilisé en pratique clinique²⁹⁴. Dans les CBNPC, il a été montré que ces TIL pouvaient avoir une valeur pronostique. Pour exemple, un essai a montré que le taux de LT CD8 au sein du stroma ajoutait une valeur pronostique significative au score TNM pour les stades I à IIIA, suggérant l'utilisation combinée de ces deux scores (TNM immuno-score)²⁹⁶. Les marqueurs CD4+, CD3+ et CD45RO+ respectivement présents à la surface des LT cytotoxiques, des LT (CD4 et CD8) et des LT mémoires sont associés à un pronostic favorable lorsqu'ils sont exprimés dans les CBNPC. Cependant, l'impact des Treg, B et NK n'est pas clairement identifié dans le CBNPC^{296,297}.

Les nouvelles technologies, telles que le séquençage à haut-débit pour mesurer la charge mutationnelle ou les néo-antigènes, la génomique ou la protéomique pour identifier des « signatures » géniques ou antigéniques ou encore l'IHC multicolore, ont été et sont utilisées dans de nombreux essais pour identifier un biomarqueur prédictif ou pronostique⁹⁹. Les résultats de ces études, bien que parfois prometteurs, ne permettent pas d'identifier un biomarqueur fiable et validé par la communauté scientifique. La recherche d'un biomarqueur prédictif ou pronostique reste donc l'un des enjeux principaux du traitement par nivolumab.

CHAPITRE 3

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'oncogenèse est un phénomène très complexe qui correspond à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale. Le développement tumoral est lié à des modifications dynamiques au sein du génome qui vont permettre aux cellules d'acquérir des nouvelles capacités, responsables d'une prolifération ou d'un pouvoir invasif accru. L'ensemble des processus impliqués dans le phénotype tumoral a été regroupé par Hanahan et Weinberg sous le terme de « *Hallmarks of cancer* ». Ils incluent de nombreuses caractéristiques, parmi lesquelles l'angiogenèse et l'échappement au système de surveillance immunitaire. Ces mécanismes résultent d'altérations impliquées dans la transduction du signal cellulaire. Les protéines à activité kinases sont des régulateurs majeurs des voies de signalisation et ont donc un rôle clé dans le phénomène d'oncogenèse.

L'angiogenèse induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène physiologique est détourné par la tumeur afin de créer un réseau vasculaire qui lui est propre, lui permettant de croître. Diverses molécules participent à sa régulation, particulièrement le VEGF qui est un facteur pro-angiogénique sécrété par les cellules tumorales lorsque celles-ci sont en hypoxie.

L'échappement au système immunitaire est une autre propriété acquise par la tumeur. Ainsi, le concept d'*immunoediting* décrit ce phénomène qui aboutit à une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Un des mécanismes impliqués dans cet échappement est l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices, tel que le PD-1, à la surface des cellules immunitaires. Ceci empêche le système immunitaire de se mobiliser contre la tumeur, en rendant les lymphocytes anergiques ou non fonctionnels.

La meilleure compréhension de l'oncogenèse a donc permis de mettre en évidence des altérations moléculaires clés inhérentes au phénotype tumoral qui constituent autant de cibles pour le développement des thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) et les immunothérapies (inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires). Le développement clinique d'ITK dirigés contre le VEGF (antiangiogénique) a constitué une avancée majeure dans la prise en charge du carcinome rénal métastatique. Pour exemple, le sunitinib a permis d'augmenter significativement les survies sans progression et globale chez des patients atteints d'un cancer

rénal métastatique par rapport à l'IFN. De même, le développement récent d'un inhibiteur de *checkpoint* immunitaire, le nivolumab (anticorps anti-PD1) a significativement augmenté la survie globale des patients atteints d'un CBNPC. Toutefois, un certain nombre de problématiques accompagnent l'utilisation de ces thérapies innovantes. D'une part, tous les patients ne bénéficient pas de la même réponse à ces traitements en raison de l'existence de résistances primaires et de la survenue de résistances adaptatives en cours de traitement chez un grand nombre d'individus. Bien que présentant moins de toxicités que les chimiothérapies conventionnelles, les thérapies ciblées et les immunothérapies peuvent être responsables d'effets indésirables sévères menant à une diminution voire à un arrêt temporaire ou définitif du traitement. A ces variabilités interindividuelles d'efficacité et de toxicités s'ajoutent le coût important de ces thérapies. Ainsi, le coût annuel de traitement pour le sunitinib est actuellement d'environ 39 500 euros par patient. Pour le nivolumab, le coût moyen annuel de traitement oscille entre 100 000 et 300 000 euros par patient. Afin de prévenir la survenue de résistances tumorales secondaires, la combinaison de ces approches agissant sur différentes cibles moléculaires mérite d'être étudiée. Néanmoins, de nombreuses questions telles que le choix des molécules, les doses, le rythme d'administration (combinaison ou administration séquentielle) doivent être résolues avant la mise en place de telles stratégies thérapeutiques.

L'identification de biomarqueurs pour le sunitinib et le nivolumab est donc un enjeu majeur afin de déterminer avant traitement les patients susceptibles de répondre à ces thérapies, de prédire la survenue de toxicités sévères et de suivre la réponse au cours du traitement. En effet, l'objectif ultime de cette démarche est de diminuer la perte de chance liée à la proposition d'un traitement inefficace ou l'exposition à des toxicités sévères inutiles pour les autres patients. Au final, de tels marqueurs permettraient de baisser le coût de ces thérapies en choisissant initialement le bon traitement pour le bon patient, à la bonne posologie.

Afin de répondre à ces attentes, différents types de biomarqueurs peuvent être évalués : le suivi pharmacologique thérapeutique (STP) basé sur la mesure de la concentration plasmatique du médicament, le suivi de biomarqueurs circulants (ADN tumoral, cytokines, facteurs pro-angiogéniques...) et l'approche « omique » (génomique, protéomique, transcriptomique...). Le STP est recommandé pour le sunitinib en raison de l'existence d'une relation PK/PD et d'une large variabilité interindividuelle de sa pharmacocinétique ¹⁹⁰. Les objectifs de ce STP sont de prévenir rapidement un éventuel échec au traitement lié à une exposition plasmatique infrathérapeutique, ainsi que de diminuer la survenue d'effets indésirables liée à une surexposition

plasmatique au traitement. Toutefois, la concentration plasmatique n'est malheureusement pas toujours le juste reflet de l'activité antitumorale. Concernant le nivolumab, très peu de données PK/PD sont actuellement disponibles. Par conséquent, la mise en place d'un éventuel STP pour l'optimisation de cette immunothérapie n'a pas encore été étudiée, d'autant plus qu'aucune méthode de dosage plasmatique n'est actuellement validée.

Concernant les biomarqueurs circulants, les études se sont principalement concentrées pour le sunitinib sur les facteurs circulants impliqués dans l'angiogénèse (VEGF, VEGFR2, PlGF, VEGR solubles) ou sur les cytokines. Certains d'entre eux semblent être des candidats prometteurs, cependant les résultats de ces études sont contradictoires et ne permettent pas de conclure clairement sur leur statut de biomarqueur. Concernant le nivolumab, le statut immunohistochimique PD-L1 reste à ce jour le biomarqueur le plus prometteur. En effet, les patients présentant un statut PD-L1 positifs semblent être de meilleurs répondeurs, bien qu'une proportion non négligeable de patients PD-L1 négatifs le soit également. L'utilisation du statut PD-L1 afin de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier d'une immunothérapie paraît donc actuellement difficile sans risquer d'exclure des patients potentiellement répondeurs.

En résumé, il n'existe actuellement aucun biomarqueur cliniquement validé par la communauté scientifique pour le sunitinib ou le nivolumab, pour autant l'identification d'un tel marqueur reste indispensable.

Les progrès des nouvelles technologies ont permis l'émergence de stratégies pour la découverte de biomarqueurs dans le cancer. Ainsi, les techniques à haut débit, telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou encore la métabolomique, sont des outils permettant de donner des profils ou des signatures comprenant l'expression d'une multitude de gènes, protéines ou métabolites. La kinomique est une approche novatrice qui permet d'étudier non pas l'expression mais la fonctionnalité des protéines kinases impliquées dans les voies de signalisation cellulaire, en étudiant leur activité de phosphorylation. Elle consiste donc à déterminer un profil phénotypique cellulaire. Cette technique de *microarray* a déjà été utilisée pour la recherche de biomarqueurs dans différentes tumeurs (mélanome, cancer bronchique, colorectal, rénal). Pour exemple, Anderson *et al.* ont récemment montré que les profils d'activité de kinases des tumeurs rénales à cellules claires pouvaient être utiles à la stratification des patients avant d'initier un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase. Cependant, toutes ces études ont été effectuées exclusivement à partir de tissus tumoraux. Or la recherche de biomarqueurs doit être facilement réalisable en routine et peu invasive pour le patient. De ce fait, la réalisation de multiples biopsies

au cours du traitement apparaît inenvisageable aussi bien sur un plan pratique qu'éthique. Il apparaît donc essentiel de déterminer une matrice de substitution au tissu tumoral qui répondrait à ces critères. Ainsi, les cellules sanguines circulantes, particulièrement les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP), représentent une matrice biologique intéressante.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) rassemblent 70 à 90 % de lymphocytes (lymphocytes B et T et cellules *natural killer*) ainsi que 10 à 30 % de monocytes et très peu de cellules dendritiques. De plus, elles sont accessibles par une simple prise de sang, de façon peu invasive et répétable. Le sunitinib, ITK à visée antiangiogénique, s'est également révélé présenter une activité immunomodulatrice. En effet, une diminution du nombre de lymphocytes voire une lymphopénie (68 % tous grades confondus¹⁷⁸), est fréquemment observée chez les patients traités par sunitinib. De façon intéressante, le sunitinib pourrait modifier le statut d'activation et la fonctionnalité des cellules immunitaires *in vitro*²⁹⁸. *In vivo*, il diminue le nombre de cellules immunosuppressives dérivées de la moelle osseuse (MDSC), à l'origine d'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs (Treg)¹⁶⁵, Cette diminution du nombre de lymphocytes Treg est associée à une amélioration de la survie²⁹⁹, inverse l'immunosuppression en inversant la balance Th1/Th2³⁰⁰ et augmente les lymphocytes T infiltrant la tumeur³⁰¹. Ces effets induits par le sunitinib impliquent potentiellement des modifications des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la fonctionnalité des lymphocytes, d'où l'intérêt d'étudier les CMSP comme matrice biologique pour la recherche de biomarqueurs.

De même pour le nivolumab, le lymphocyte pourrait être une matrice biologique de substitution intéressante au tissu tumoral pour évaluer l'approche kinomique chez des patients cancéreux. Par le blocage de la liaison de PD-1 avec les ligands PD-L1 et PD-L2 qui sont exprimés par les tumeurs, le nivolumab potentialise l'activation des cellules T favorisant la réponse immunitaire antitumorale.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'évaluer les CMSP comme matrice biologique pour la recherche de biomarqueurs par approche kinomique selon deux modèles :

- **un modèle indirect** chez des patients atteints d'un carcinome rénal métastatique et traités par sunitinib, ITK antiangiogénique qui possède des effets immunomodulateurs ;
- **un modèle direct** chez des patients atteints d'un CBNPC et traités par nivolumab, un anticorps qui cible le récepteur PD-1 situé à la surface de nombreuses cellules immunitaires.

Les résultats obtenus s'articulent autour de trois axes :

- dans un premier temps, les profils kinomiques (avant traitement) de patients atteints de carcinome rénal métastatique ont été utilisés afin d'étudier les effets *ex vivo* du sunitinib sur l'activité des tyrosine kinases de CMSP ainsi que les voies de signalisation cellulaires impliquées ;
- dans un deuxième temps, une méthode de dosage plasmatique du nivolumab a été développée afin d'évaluer par la suite si l'exposition plasmatique au nivolumab influence le profil kinomique des patients atteints d'un CBNPC et traités par nivolumab
- dans un dernier temps, les profils kinomiques des patients atteints d'un CBNPC et traités par nivolumab ont été étudiés avant traitement et à J14 du traitement afin de déterminer les effets pharmacodynamiques du nivolumab sur les CMSP.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

1 Article 1 : Identification de biomarqueurs pharmacodynamiques du sunitinib

1.1.1 Introduction et objectifs

Le sunitinib présente des effets immuno-modulateurs largement décrits dans la littérature. Il est fréquemment responsable d'une diminution du nombre de lymphocytes totaux circulants voire d'une lymphopénie (68% tous grades confondus¹⁷⁸). Powles *et al.* ont rapporté lors d'une étude chez 43 patients atteints de cancer rénal métastatique (CCRm), après 6 cycles de traitement par sunitinib, une diminution du nombre de lymphocytes totaux (17 %) ainsi qu'une diminution des populations lymphocytaires CD3 (21 %), CD4 (27 %) et CD8 (29 %) ³⁰². Cependant, aucune relation n'a pu être établie entre la diminution du nombre de lymphocytes et la survie sans progression (SSP). Etant donné que chaque cycle de traitement se définit par 4 semaines de sunitinib suivies de 2 semaines de pause, il est possible que l'effet du sunitinib soit plus marqué avant la pause plutôt qu'après 6 cycles de traitement. Par ailleurs, une diminution du nombre de lymphocytes Treg circulant est associée à une meilleure survie globale après 2 à 3 cycles de traitements par sunitinib chez des patients présentant un CCRm²⁹⁹. L'ensemble de ces éléments suggère que le sunitinib, en plus d'avoir un effet sur les cellules tumorales, aurait un impact sur les lymphocytes.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail a été d'étudier rétrospectivement l'évolution du nombre de lymphocytes circulants périphériques comme marqueur pharmacodynamique chez des patients traités par sunitinib pour un CCRm en première ligne. Etant donné que les CMSP sont essentiellement composées de lymphocytes, cette première étape est préalable à l'évaluation des CMSP en tant que tissu de substitution pour l'analyse kinomique.

Le second objectif a été d'évaluer de façon prospective à l'aide d'une approche kinomique l'activité globale des protéines tyrosine kinases (PTK) au sein des CMSP de patients naïfs atteints de CCRm avant l'initiation du sunitinib ; puis d'étudier les effets *ex vivo* du sunitinib et de son métabolite actif (SU12662) sur les voies de signalisation des CMSP.

1.1.2 Matériels et méthodes

1.1.2.1 Etude clinique rétrospective

L'étude clinique rétrospective a été réalisée à partir d'une cohorte de patients suivis au sein du service d'oncologie médicale de l'hôpital Cochin. Les patients étaient tous traités par sunitinib en première ligne pour la prise en charge d'un CCRm entre juin 2006 et janvier 2015.

L'ensemble des paramètres hématologiques (hémoglobine, plaquettes, neutrophiles et lymphocytes) ont été étudiés en pré-thérapeutique (J0) et 21 jours après l'initiation du sunitinib (J21). Chaque critère a également été exprimé sous forme de ratio (J21/J0) afin de refléter leur évolution sous traitement. Par ailleurs, l'exposition plasmatique composite (sunitinib et SU12662) a été déterminée à J21 après l'initiation du traitement.

Une analyse univariée puis multivariée selon le modèle de Cox a été réalisée afin d'identifier les facteurs prédictifs de la SSP.

1.1.2.2 Etude kinomique prospective

Entre mars 2015 et novembre 2015, 12 volontaires sains et 21 patients atteints de CCRm naïfs de tout traitement ont été inclus dans l'étude kinomique. Chacun des participants a signé un consentement éclairé.

Les CMSP ont été isolés à partir d'un prélèvement de sang total (10 mL) par une technique de gradient de Ficoll. Puis 3,5 millions de cellules ont été lysées par 140 μ L de tampon MPER additionné d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (1 %) avant d'être centrifugées (12000 rpm, 15 min, 4°C) et stockées à -80°C.

Après un dosage protéique du lysat cellulaire par la technique de Bradford, 2 à 4 μ g de protéines sont ajoutées à une solution d'anticorps anti-phosphotyrosine marqués à la fluorescéine et d'ATP (100 μ M). Puis, les lysats volontaires sains et les patients CCRm ont été directement déposés sur un puits d'une puce tyrosine kinase PamChip[®]. Par ailleurs, la méthodologie « *on-chip* » a également été appliquée aux patients en ajoutant aux lysats une solution aqueuse contenant soit du sunitinib (1 μ M), soit du métabolite actif SU12662 (1 μ M), soit du DMSO (diméthylsulfoxyde à 0,1 %) utilisé en contrôle. Chacun des puits contient une membrane composée d'oxyde d'aluminium sur laquelle sont immobilisés 144 peptides (13 acides aminés) comprenant chacun des résidus tyrosine connus. Le mélange est pompé à travers la membrane de l'*array* et l'évolution de la phosphorylation est suivie pendant toute l'incubation par une caméra.

Le signal lumineux fluorescent est transformé en signal analogique. L'analyse des profils d'activité des kinases (profils kinomiques) et l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel BioNavigator[®].

1.1.3 Résultats

1.1.3.1 Etude rétrospective préliminaire

Au total, 88 patients CCRm traités par sunitinib en première ligne ont été inclus. L'âge médian était de 62 ans. L'histologie la plus fréquemment retrouvée était le carcinome rénal à cellules claires (71 % des cas). D'après la classification pronostique de Heng, la majorité des patients étaient de pronostic intermédiaire (57 %), et un tiers d'entre eux étaient de mauvais pronostic (36 %).

La SSP médiane au sein de la cohorte était de 234 jours (Intervalle de confiance à 95 %, IC95%, 179-289).

Selon le modèle de Cox, l'analyse multivariée a montré que le ratio des lymphocytes totaux J21/J0 (*Hazard Ratio* [HR], 1,83; IC95%, 1,24-2,71; $p= 0,0023$), l'indice de performance ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) 0-1 (HR, 0,44; IC95%, 0,23-0,84; $p= 0,0135$) et l'indice de masse corporelle (HR, 0,86; IC95%, 0,80- 0,93; $p= 0,0001$) étaient indépendamment associés à la SSP.

1.1.3.2 Etude kinomique prospective

L'analyse des profils kinomique de base de CMSP de 12 volontaires sains et de 21 patients atteints de CCRm à J0 a montré que la phosphorylation des peptides était significativement inférieure chez les patients pour 76 peptides ($p<0,05$). Malgré l'hétérogénéité des profils observée chez les patients, une analyse en composantes principales (PCA) a montré une tendance à séparer les profils des patients CCRm de ceux des volontaires sains. Ces résultats suggèrent que les profils kinomiques des patients pourraient être différenciés de ceux des volontaires sains.

L'étape suivante a été d'étudier les effets *ex vivo* du sunitinib et du SU12662 sur les CMSP de patients CCRm. Les profils kinomiques d'inhibition, obtenus par différence de phosphorylation des peptides en présence et en absence d'inhibiteur, ont montré une diminution de phosphorylation pour l'ensemble des peptides. L'effet inhibiteur du sunitinib était supérieur à

celui du métabolite SU12662. Par ailleurs, plusieurs kinases impliquées dans la réponse immunitaire telles que Zap70, Src, Fyn, Yes1 and DDR1 semblaient être inhibées par le sunitinib ou son métabolite actif.

Enfin, il a été observé que les profils présentant une plus faible inhibition *ex vivo* par le sunitinib ou le SU12662, était d'une part, associés à un mauvais score pronostic de Heng et d'autre part, à une diminution du ratio lymphocytes totaux J21/J0.

1.1.4 Discussion

Cette étude rétrospective a permis de montrer pour la première fois que le ratio lymphocytes totaux à J21 pouvait être utilisé comme marqueur pharmacodynamique chez les patients atteints de CCRm traités par sunitinib. Ainsi, une diminution du nombre de lymphocytes totaux circulants, sans pour autant avoir une lymphopénie, après 21 jours de sunitinib est associée à une SSP plus longue. Ceci suggère que le ratio lymphocytaire J21/J0 pourrait être un facteur pronostic intéressant. Il constitue un paramètre dynamique reflétant la variation rapide du nombre de lymphocytes sous sunitinib. La diminution du nombre de lymphocytes ne semble cependant pas être liée à un effet toxique du sunitinib. En effet, Krusch *et al.* n'ont pas observé d'effet cytotoxique du sunitinib sur les CMSP³⁰³. En revanche, deux études récentes ont rapporté un recrutement des lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral^{301,304}. Par ailleurs, l'inhibition de la voie du VEGF par le sunitinib entraîne l'expression de différentes molécules chimioattractives dans les vaisseaux tumoraux³⁰⁴. Enfin, le sunitinib est connu pour diminuer le nombre de cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse, ce qui entraîne une diminution des lymphocytes T³⁰⁵. L'ensemble de ces données suggèrent que la diminution des lymphocytes associée à une meilleure SSP pourrait être liée à une redistribution des lymphocytes totaux circulants vers le compartiment intratumoral, à l'origine d'une immunité anti-tumorale. D'autres études sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Ce travail montre également pour la première fois l'existence d'une différence entre les profils kinomiques de patients naïfs atteints de CCRm et ceux de volontaires sains. De façon intéressante, une moindre activité des PTK chez les patients a été observée. L'anergie des lymphocytes T semble être une hypothèse expliquant ce phénomène³⁰⁶. L'épuisement des lymphocytes est dépendante de molécules de co-stimulation inhibitrices telles de que le *Programmed Death-1* (PD-1) dont le niveau d'expression est augmenté par le VEGF-A^{307,308}. Or,

Harmon *et al.* ont rapporté que la concentration plasmatique de VEGF-A était 3 à 4 fois plus important chez les patients atteints de CCRm que chez les volontaires sains ²²⁵. De plus, une augmentation de l'expression du PD-1 a été observé chez les patients CCRm au niveau des lymphocytes T circulants, des monocytes et des cellules *Natural Killer* ³⁰⁹. L'ensemble de ces données suggèrent qu'une augmentation du PD-1 au sein des CMSP pourrait être responsable d'une activité des PTK faible chez nos patients, bien que la différence d'âge entre les patients et les volontaires sains (69 vs 50 ans) inclus dans l'étude ne doit pas être négligée.

Cette étude a montré que le sunitinib et le SU12662 inhibaient *ex vivo* un grand nombre de kinases, parmi lesquelles Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2), PDGFR, kit, Flt-3 et RET, qui sont des cibles connues du sunitinib ¹⁷⁰. Ces résultats permettent de valider l'utilisation des CMSP comme matrice biologique. Toutefois, il existe des différences entre les arbres kinomiques obtenus dans notre étude et ceux précédemment rapportés dans la littérature ⁷⁰. Ces différences proviennent probablement du fait que ces derniers ont établis ces arbres dans des conditions *in vitro* et représentent l'affinité (ou plus exactement des CI_{50}) du sunitinib pour des kinases purifiées. La grande variabilité interindividuelle en termes de sensibilité au sunitinib ou au SU12662 *ex vivo* pourrait contribuer à la variabilité des effets immuno-régulateurs du sunitinib chez les patients CCRm.

Parmi tous les paramètres testés, seul le score pronostic de Heng était corrélé aux profils d'inhibition *ex vivo*. Il est intéressant de souligner que l'inhibition du sunitinib ou du SU12662 est plus faible chez les patients présentant un mauvais pronostic. Ceci suggère que le traitement par sunitinib serait moins efficace chez les patients présentant une inhibition *ex vivo* plus faible des PTK de CMSP par le sunitinib ou le SU12662.

Enfin, une relation positive a été observée entre le degré d'inhibition de phosphorylation de différents peptides et le ratio des lymphocytes totaux J21/J0. Etant donné que ce dernier était associé à la SSP dans l'étude rétrospective, ce résultat suggère que le profil kinomique *ex vivo* pourrait être utilisé comme facteur pronostique.

Pour conclure, ce travail suggère le ratio des lymphocytes totaux J21/J0 comme biomarqueur pharmacodynamique de la SSP. De plus, la large variabilité interindividuelle des profils kinomiques (en présence ou non de sunitinib) associée à la relation entre le score de Heng et le profil kinomique *ex vivo* justifient dans le futur une utilisation approfondie des CMSP comme matrice biologique pour la recherche de biomarqueurs par approche kinomique chez des patients

atteints de CCRm traités par sunitinib. Une analyse complémentaire est en cours pour évaluer la relation entre la SSP et le profil kinomique *ex vivo*.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Gaëlle Noé, Audrey Bellesoeur, Audrey Thomas-Schoemann, et al. Clinical and kinomic analysis identifies peripheral blood mononuclear cells as a potential pharmacodynamic biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib ³¹⁰.

Clinical and kinomic analysis identifies peripheral blood mononuclear cells as a potential pharmacodynamic biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib

Gaëlle Noé^{1,2,*}, Audrey Bellesoeur^{1,2,3,*}, Audrey Thomas-Schoemann^{1,2}, Savithri Rangarajan⁴, Faris Naji⁴, Alicja Puszkiet¹, Olivier Huillard³, Nathaniel Saidu⁶, Lisa Golmard⁵, Jerome Alexandre^{3,6}, Francois Goldwasser^{3,6}, Benoit Blanchet¹ and Michel Vidal^{1,2}

¹ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, UF « Pharmacocinétique et Pharmacochimie », Paris, France

² UMR8638 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service de Cancérologie médicale, Paris, France

⁴ PamGene International BV, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

⁵ Institut Curie, Département de Biopathologie, Paris, France

⁶ U1016 INSERM, UMR 8104 CNRS, UMR-S1016, CARPEM, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Benoit Blanchet, email: benoit.blanchet@aphp.fr

Keywords: sunitinib, kinome, PBMC, renal carcinoma

Received: April 14, 2016

Accepted: July 10, 2016

Published: August 29, 2016

ABSTRACT

Background: Sunitinib is a protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor that has immune-modulating properties. In this context, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), mainly constituted by lymphocytes, could be a perfect surrogate tissue for identifying and assaying pharmacodynamic biomarkers of sunitinib. In this study, we investigated the changes in lymphocytes count as pharmacodynamic biomarker in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients under sunitinib therapy. Thereafter, we studied the *ex vivo* effect of sunitinib and SU12262 (active metabolite) on PBMC from naïve mRCC patients using a high throughput kinomic profiling method.

Methods: The prognostic value of total lymphocytes count between Day 0 and Day 21 (expressed as a ratio D21/D0) was retrospectively investigated in 88 mRCC patients under sunitinib therapy. PTK PamChip® microarrays were used to explore prospectively the *ex vivo* effect of sunitinib and SU12662 on PTK activity in PBMC from 21 naïve mRCC patients.

Results: In this retrospective study, D21/D0 lymphocytes ratio (Hazard Ratio, 1.83; CI95%, 1.24-2.71; p=0.0023) was independently associated with PFS. Interestingly, kinomic analysis showed that D21/D0 lymphocytes ratio and Heng prognostic model was statistically associated with the *ex vivo* sunitinib and SU12662 effect in PBMC.

Conclusion: The present study highlights that D21/D0 total lymphocytes ratio could be a promising pharmacodynamic biomarker in mRCC patients treated with sunitinib. Additionally, it paves the way to investigate the kinomic profile in PBMC as a prognostic factor in a larger cohort of mRCC patients under sunitinib therapy.

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) is the third most common malignancy of the urinary tract and is responsible each year for 338,000 new cases worldwide [1]. This

cancer is considered to be an immunogenic tumor and a number of immunotherapeutic approaches have been exploited so far [2]. Until 2006, cytokines based immunotherapy (interferon- α and interleukin-2) was the only proven systemic therapy with a limited clinical

efficacy. A better understanding of RCC biology has led to the approval of new targeted therapies, including kinase inhibitors such as vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors.

The use of kinase array technology to evaluate global kinase activities implied in cell signaling (« kinome ») in tumors from patients and to seek biomarkers for kinase inhibitors [3-7] is currently spreading. Recently, Anderson *et al.* have showed that the kinase profiling of clear cell RCC tumors could provide a functional classification strategy before starting a kinase inhibitor therapy [8]. Although these results are very promising, this strategy to process biopsy tumor before treatment initiation may fail to reflect current tumor dynamics and drug sensitivity, which may change during therapy. Additionally, processing repeated tumor biopsy cannot routinely be performed over the treatment course because of the invasive characteristic of the technique. Circulating cells could be an ideal biological matrix for biomarker discovery. In this context, we hypothesized that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could be a perfect surrogate tissue for identifying and assaying pharmacodynamic biomarkers of kinase inhibitors, as this tissue is readily accessible for repeat sampling throughout therapy. To the best of our knowledge, no data is currently available about the use of PBMC as surrogate tissue for the evaluation of global kinase activity in cancer patients.

Sunitinib, the first tyrosine kinase inhibitor developed for the VEGF pathway, is currently the standard first-line treatment for metastatic RCC (mRCC). Sunitinib is known to have immunomodulating properties in addition to its antiangiogenic activity [2, 9]. Interestingly a study by Powles *et al.* reported a significant reduction in the number of peripheral total lymphocytes (17%), CD3 (21%), CD4 (27%) and CD8 (29%) T-cells after completion of the first 6-week cycle of therapy in 43 mRCC patients [10]. No relationship was however found between this decline in lymphocytes count and progression free survival (PFS). Since each cycle consisted of 4 weeks of sunitinib followed by 2 weeks off the drug, it is possible that the effects on cell counts may be more marked before temporary discontinuation of sunitinib rather than at the end of the 6-week cycle. Furthermore, Adotevi *et al.* showed that the overall survival is significantly longer in mRCC patients showing a decrease in the number of Foxp3+ regulatory T-cells after 2 or 3 cycles of treatment [11]. In this context, further investigations are required to assess the changes in lymphocytes count as pharmacodynamic biomarker. Given PBMC are mainly constituted by lymphocytes (~85%) [12], those investigations are a mandatory step before the evaluation of PBMC as surrogate tissue for kinomic analysis.

The present study aimed first, to retrospectively evaluate the changes in lymphocytes count at day 21 after sunitinib start in mRCC patients as a pharmacodynamic

biomarker, and secondly, to assess the global protein tyrosine kinase (PTK) activity in PBMC from naïve mRCC patients before sunitinib treatment. A high throughput kinomic profiling method was employed to examine the effects of sunitinib and its active metabolite SU12662 on intracellular signaling pathways in PBMC.

RESULTS

Retrospective preliminary study

Eighty-eight mRCC patients treated with sunitinib were included. Baseline patients' characteristics are summarized in Table 1. Median age was 62 years old [54-68]. The most frequent histological tumor type was clear cell carcinoma (71%). According to the Heng prognostic index model, most of the patients had an intermediate prognosis (57%) and about a third (36%) had a poor prognosis. Twenty-three patients (26%) developed lymphopenia during the first cycle of sunitinib treatment, with seven (8%) of grade ≥ 2 .

The median PFS in the cohort was 234 days (confidence interval, CI95%, 179-289). In univariate analysis (Table 2), the lymphocytes ratio between day 0 (before treatment starts, D0) and day 21 of treatment (D21), was the single hematological ratio at day 21 associated with PFS. An increase in lymphocyte count on day 21 was significantly associated with a poorer prognosis ($p = 0.0028$). Multivariate Cox proportional hazards model analysis showed that lymphocyte D21/D0 ratio (hazard Ratio [HR], 1.83; CI95%, 1.24-2.71; $p = 0.0023$), ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status 0-1 (HR, 0.44; CI95%, 0.23-0.84; $p = 0.0135$) and body mass index (HR, 0.86; CI95%, 0.80-0.93; $p = 0.0001$) were independently associated with PFS.

Basal PTK activity in PBMC from mRCC patients and healthy volunteers

In continuum of the previous clinical results, we conducted a study to compare the PTK activities in PBMC from mRCC patients and healthy volunteers using peptide microarrays. The clinical and biological characteristics of naïve mRCC patients population ($n = 21$) before sunitinib treatment initiation are summarized in Table 3. Median age was 50 [48-57] years in healthy volunteers ($n = 12$), and half of them were male.

A large interindividual variability in kinomic profiles (Figure 1A) was observed, especially in mRCC patients, which could not be correlated with various baseline clinical and biological parameters tested. Even so, unsupervised Principal Component Analysis (PCA) showed a tendency of separation between patients and healthy volunteers (Figure 1B) with a tendency of clustering in the case of

Table 1: Baseline characteristics of the retrospective cohort

Characteristics	N= 88
Demographic data	
Sex, n (%)	
Male	62 (71)
Female	26 (29)
Age (years)	62 [54-68]
Age > 70 years-old, n (%)	18 (20)
BMI (kg/m ²)	24.4 [22.3-27.9]
Lean Body Mass (kg)	56.0 [46.1-62.2]
ECOG performance status, n (%)	
0	19 (22)
1	50 (58)
2	12 (13)
3-4	7 (7)
Renal cell carcinoma characteristics	
Histological tumor type, n (%)	
Clear cell carcinoma	63 (71)
Papillary carcinoma	5 (6)
Other	20 (23)
Metastasis, n (%)	
Synchronous	43 (49)
Metachronous	45 (51)
Fuhrman's grade, n (%)	
1-2	13 (23)
3	28 (48)
4	17 (29)
Missing	30 (34)
Nephrectomy, n (%)	
Yes	76 (86)
No	12 (14)
Heng score, n (%)	
Favorable	6 (7)
Intermediate	50 (57)
Poor	32 (36)
Baseline Biological data	
Haemoglobin (g/dL)	12.6 [11.3-13.9]
Platelets (x10 ⁹ /L)	280 [230-375]
Lymphocytes (x10 ⁹ /L)	1.54 [1.13-1.99]
Neutrophils (x10 ⁹ /L)	5.24 [3.69-6.83]
Lymphopenia before Sunitinib treatment, n (%)	36 (41)
LDH	
Increased above ULN	22 (29)
Normal	54 (61)
Missing	12 (14)

BMI, body mass index; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; ULN, Upper Limit of Normal. Results are expressed as median [interquartile range] or frequency (percent).

Table 2: Results of Univariate and Multivariate Analysis of Progression Free Survival prognostic factors (n=88)

Variables (units)	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard Ratio [CI95%]	p-value	Hazard Ratio [CI95%]	p-value
Male Sex	0.71 [0.42-1.18]	0.18		
Age (years)	0.99 [0.97-1.02]	0.58		
ECOG 0-1	0.56 [0.31-1.01]	0.053	0.44 [0.23-0.84]	0.0135
Lean body mass (kg)	0.96 [0.94-0.98]	0.0003		
BMI (kg/m ²)	0.87 [0.82-0.93]	<0.0001	0.86 [0.80-0.93]	0.0001
Metachronous metastasis	0.71 [0.44-1.14]	0.154		
Clear cell carcinoma histological type	0.44 [0.26-0.75]	0.0025		
Fuhrman's grade 4*	2.20 [1.15-4.19]	0.0167		
Nephrectomy	0.31 [0.15-0.62]	0.0010		
Heng score		0.0216		
Favourable (n=6)	0.33 [0.12-0.97]			
Intermediate (n=50)	0.54 [0.33-0.89]			
Poor (n=32)	1			
Increased LDH**	1.21 [0.70-2.10]	0.495		
Steroids comedication	1.22 [0.62-2.39]	0.569		
Baseline Lymphocytes (x10 ⁶ /L)	0.77 [0.58-1.02]	0.0649		
Baseline NLR	1.05 [1.00-1.11]	0.041		
Haemoglobin D21/D0	1.19 [0.13-10.95]	0.877		
Platelets D21/D0	0.96 [0.43-2.12]	0.909		
Lymphocytes D21/D0	1.72 [1.21-2.45]	0.0028	1.83 [1.24-2.71]	0.0023
Neutrophils D21/D0	1.50 [0.46-4.84]	0.5		
G3-4 induced-lymphopenia during the first cycle	1.23 [0.53-2.87]	0.625		
No lymphopenia prior Sunitinib treatment	1.09 [0.67-1.79]	0.73		
Composite AUC _{ss} ^a at D21	0.93 [0.69-1.25]	0.621		

AUC_{ss}, Area under the curve of plasma concentration at steady-state; BMI, body mass index; CI95%, confidence interval 95%; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; G, Grade according to NIC-CTCAE V4; LDH, Lactate Dehydrogenase; NLR, Neutrophil to Lymphocyte Ratio; PFS, progression-free survival;

* n=58; ** n=76

^aComposite AUC_{ss} is the sum of sunitinib and SU12662 (active metabolite) AUC. It was assayed at day 21 after the sunitinib start.

healthy volunteers. Furthermore, several peptides showed significantly lower phosphorylation levels in PBMC from patients when compared to healthy volunteers (76 with $p < 0.05$, 45 with $p < 0.01$) (Figure 1C), suggesting that overall kinomic profiles of naive mRCC patients' PBMC could be differentiated from those of healthy individuals. Functional ontology enrichment analysis using Metacore software (GeneGO)TM showed that several pathways were deregulated in patient PBMC, including immune response (FC epsilon RI-, CD28-, CCR5-, CD16- signaling), the EGFR (ERK inhibition, PI3K/AKT- and MAPK-

signaling), FGF-family and FGFR-signaling, along with chemotaxis (CXCR4- signaling).

Ex vivo PTK inhibitory effects of sunitinib and SU12662

The next step was to study the *ex vivo* effect of sunitinib or SU12662 (active metabolite) in PBMC lysates from 21 naive mRCC patients. Inhibition profiles obtained after *ex vivo* exposure to either sunitinib or SU12662 showed that PTK substrate phosphorylation levels were

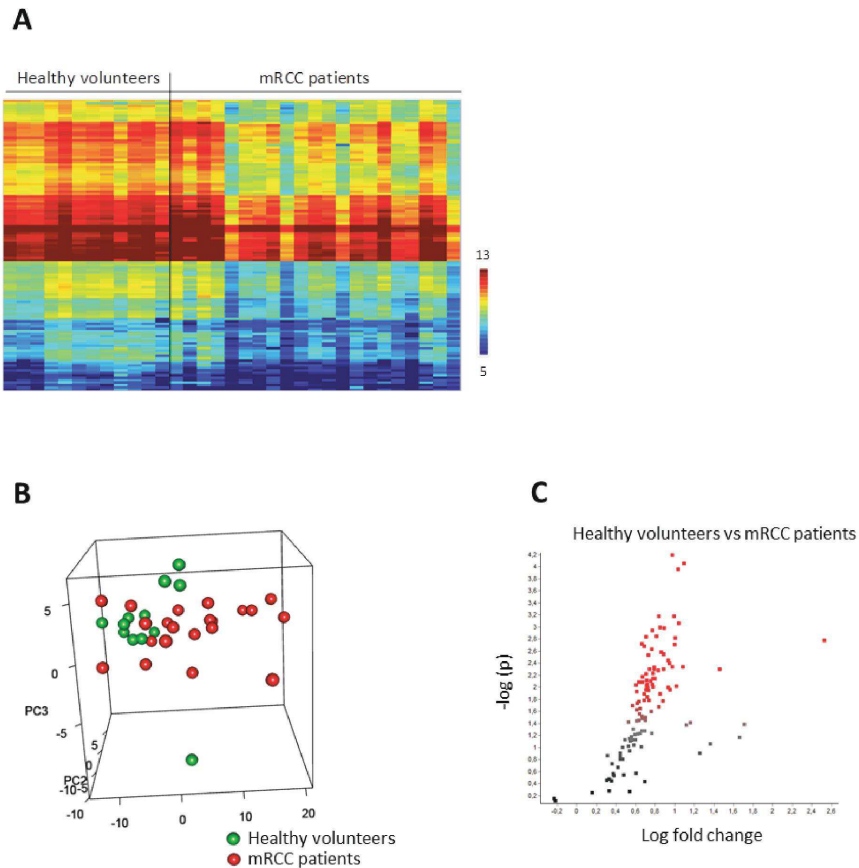


Figure 1: Basal protein tyrosine kinase activity profiles (Log₂Signal) in PBMC from healthy volunteers ($n = 12$) and metastatic renal cell carcinoma patients ($n = 21$). **A.** The heatmap shows rows (representing 110 peptides of the “QC List”) sorted by hierarchical clustering using Euclidean distance metrics and complete linkage. **B.** The 3D plot shows 3 new variables (PC1-3) obtained after applying Principal Component Analysis (PCA), each point representing a sample colored according to PBMC source. **C.** The volcano plot shows the result of *T*-test: the effect size, i.e. LFC (Log₂Signal (Healthy) - Log₂Signal (mRCC)), versus significance (-Log₁₀*p*). Peptides with significant *p*-values (< 0.05) are marked in red.

Table 3: Baseline characteristics of patients included in the kinomic analysis

Baseline characteristics	Patients (n=21)
Demographic data	
Sex, n (%)	
Female	7 (33)
Male	14 (67)
Age (years)	69 [60-74]
BMI (kg/m ²)	25.0 [24.1-27.0]
ECOG, n (%)	
0	4 (19)
1	9 (43)
2	7 (33)
3	1 (5)
Renal cell carcinoma characteristics, n (%)	
Histological tumor type, n (%)	
Clear cell carcinoma	17 (77)
Papillary carcinoma	1 (9)
Other	3 (14)
Metastasis	
Yes	21 (100)
No	0 (0)
Heng score, n (%)	
Favorable	2 (10)
Intermediate	12 (57)
Poor	7 (33)
Prior nephrectomy, n (%)	
Yes	17 (81)
No	4 (19)
Lymphocytes profile at day 0	
Baseline total lymphocytes (x10 ⁹ /L)	1.3 [1.2-1.7]
Lymphopenia before Sunitinib treatment, n (%)	13 (62)

BMI, body mass index; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group;

Results are expressed as median [interquartile interval] or frequency (percent)

reduced. Interestingly, the inhibitory effect of sunitinib was stronger than that of SU12662. A two-way analysis of variance (ANOVA) (Figure 2A, 2B) allowed the identification of peptides that were significantly inhibited (106 and 102 peptides for sunitinib and SU12662, respectively, $p < 0.05$). Putative upstream PTK were

determined by using Kinexus Kinase Predictor. The top 15 PTK that were inhibited are presented on kinome trees for sunitinib (Figure 2C) and SU12662 (Figure 2D). Amongst them, were some that are implicated in immune response, in particular Zap70, Src, Fyn, Yes1 and DDR1.

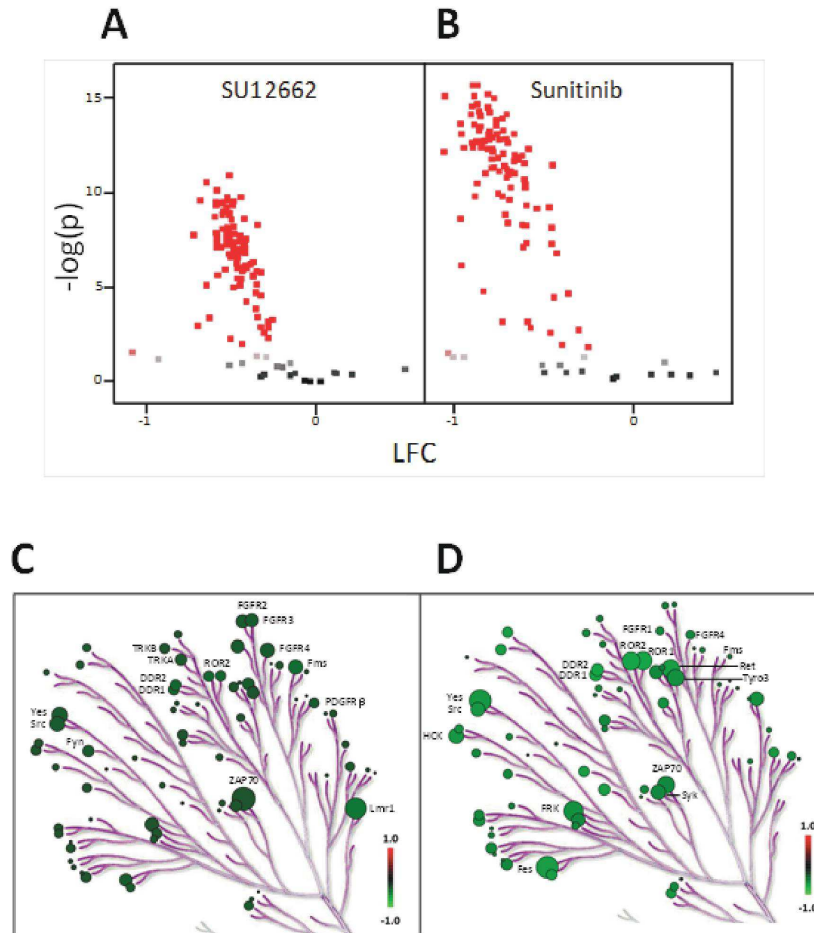


Figure 2: Ex vivo inhibition of sunitinib and SU12662 on protein tyrosine kinase activity in PBMC from metastatic renal cell carcinoma patients ($n = 21$). A. and B. : The volcano plots show the result of an ANOVA post-hoc test. The effect size i.e. LFC (Log₂Signal (SU12662 A. OR Sunitinib B.) - Log₂Signal (DMSO)) versus significance (-Log₁₀P). Peptides with significant p-values (< 0.05) are marked in red. BioNavigator® interfaced with R was used to generate the graphs. C. and D. : Upstream kinase analysis of the same data set using BioNavigator® interfaced with R, were mapped to a phylogenetic tree of the kinome using the Kinome Renderer tool [35]. Only the 15 main kinases inhibited by sunitinib or SU12662 are presented. The size of the circles indicates the specificity score of the corresponding kinases and the green color relates to the effect size with lower inhibition being darker. Image reproduced courtesy of Cell Signaling Technologies Inc.

Correlation of *ex vivo* inhibition profiles and heng prognostic score

The *ex vivo* inhibition profiles of sunitinib and SU12662 were statistically correlated with Heng prognostic scores. Thus, mRCC patients with poor prognosis presented a lower inhibitory effect of either sunitinib (Figure 3A) or SU12662 (Supplementary Figure 1A). A tendency of separation between intermediate and poor prognosis groups was observed after applying PCA,

and phosphorylation inhibition was significantly different between these 2 prognosis groups (53 and 23 peptides for sunitinib and SU12662, respectively, $p < 0.05$) (Figure 3B and Supplementary Figure 1B). Using GeneGO™, we observed that signaling pathways including VEGF-, HGF-, FGFR- and EGFR- for sunitinib and PDGFR for SU12662 were statistically more inhibited in the intermediate prognosis group. Kinases involved in the immune response such as, Itk, Tec, Btk, Lyn, Syk and Zap 70 were the most inhibited by both sunitinib and SU12662 in the intermediate group.

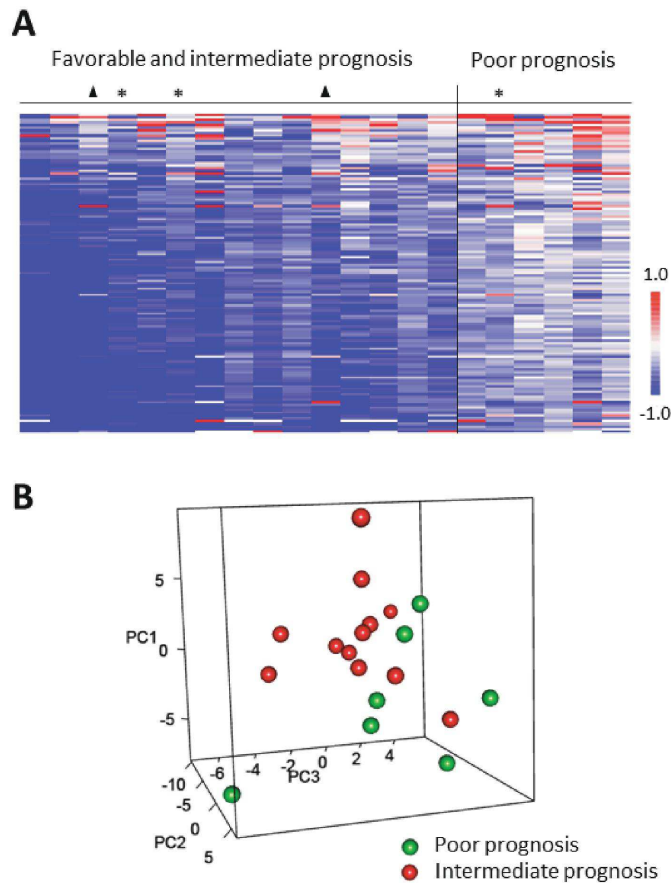


Figure 3: Correlation of *ex vivo* sunitinib-related inhibition profiles in PBMC from metastatic renal cell carcinoma patients to Heng prognostic scores. **A.** The heatmap of LFC ($\text{Log}_2(\text{Signal}(\text{Sunitinib})) - \text{Log}_2(\text{Signal}(\text{DMSO}))$) shows columns ($n = 21$) sorted by column mean and rows (representing 110 peptides of the “QC List”) sorted by row mean. When Heng prognostic score was overlaid on the data, higher inhibition (lower LFC) corresponded to favorable (▲) or intermediate scores except for 3 outliers (*). **B.** The 3D plot shows 3 new variables (PC 1-3) obtained after applying Principal Component Analysis (PCA), each point ($n = 19$) representing a sample colored according to Heng prognostic score. Only intermediate and poor prognostic groups were included in this statistical analysis.

Relationship between *ex vivo* inhibition profiles and lymphocytes D21/D0 ratio

Based on the prognostic value of D21/D0 lymphocytes ratio, we investigated the relationship between this ratio and the *ex vivo* kinomic inhibition profiles sunitinib and SU12662. Five patients could not be assessed on day 21 due to death ($n = 1$) and early discontinuation of treatment related to severe toxicities ($n = 4$). Interestingly, a linear relationship was found with both the *ex vivo* inhibition profiles of sunitinib (20 peptides with $p < 0.05$) and SU12662 (18 peptides with $p < 0.05$). Lower D21/D0 lymphocytes ratio was associated with higher phosphorylation inhibition of these peptides for sunitinib (Figure 4) and SU12662 (Supplementary Figure 2).

DISCUSSION

This retrospective clinical study is the first to show that D21/D0 lymphocytes ratio could be used as a pharmacodynamic biomarker in mRCC patients under sunitinib therapy. The kinomic study that followed shows that both sunitinib and SU12662 induce PTK inhibition in PBMC. Additionally, their *ex vivo* effect on PBMC are

statistically correlated with both Heng prognostic score and D21/D0 lymphocytes ratio. Together, these data suggest that a stronger *ex vivo* sunitinib- and SU12662-induced inhibition in PBMC kinome profile before sunitinib start would be associated with a better prognosis in mRCC patients.

The present retrospective clinical study highlights that a decrease in lymphocytes count on D21 was associated with a longer PFS and could therefore be an interesting prognostic factor. Pretreatment lymphopenia is traditionally considered as a poor prognostic factor in naïve RCC patients [13]. The D21/D0 lymphocytes ratio is not necessarily associated with pathological values and constitutes a dynamic parameter reflecting rapid variations in lymphocytes count under sunitinib treatment. Moreover, this ratio seems to be a better prognostic factor than either pre-treatment lymphopenia or neutrophil to lymphocyte ratio (NLR). Different clinical studies have reported that lower baseline NLR is associated with longer PFS, suggesting baseline NLR as an interesting prognostic factor [14-16]. In the present study, lower baseline NLR was only associated with longer PFS in the univariate analysis, probably because all the patients included in our cohort were treated in first line with sunitinib and could therefore have a less inflammatory disease than other patients included in the

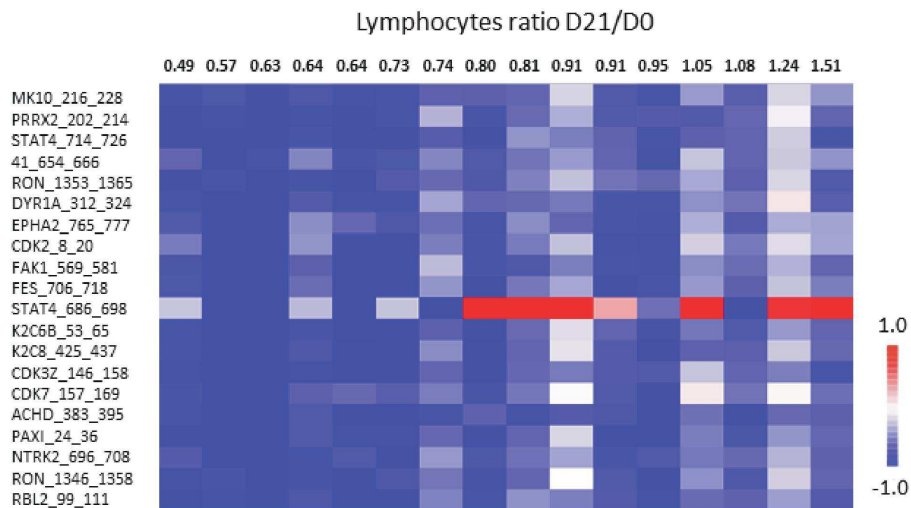


Figure 4: Relationship between *ex vivo* sunitinib-related inhibition profiles in PBMC from metastatic renal cell carcinoma patients and lymphocytes ratio D21/D0 ($n = 16$). The heatmap of LFC ($\text{Log}_2\text{Signal (Sunitinib)} - \text{Log}_2\text{Signal (DMSO)}$) shows 20 peptides (Y axis) which present linear correlation between LFC and lymphocytes ratio (X axis). Each column represents one patient. The rows show 20 significant ($p < 0.05$) peptides derived from a one-way ANOVA. When lymphocytes ratio was overlaid on the data, higher inhibition (lower LFC) corresponded to lymphocytes count decreased at D21. Graph on the right show the same results for one peptide in a dot plot.

previous studies. Additionally, the baseline NLR ratio indicative of the balance between host immunity and cancer-related inflammation does not take account of the interindividual variability in the pharmacodynamic effect of sunitinib, while the total peripheral lymphocytes D21/D0 ratio does. The decline in lymphocytes count on D21 seems unlikely due to a cytotoxic drug effect on peripheral lymphocytes for two reasons. Firstly, it was associated with an increased PFS in our cohort. Secondly, Krusch *et al.* did not report *in vitro* cytotoxicity of increased sunitinib concentrations on PBMC [17]. By contrast, two recent studies have documented that sunitinib enhances T-lymphocytes recruitment in tumor microenvironment [18, 19]. Thus, the sunitinib-related inhibition of VEGF signaling results in up-regulation of chemokines CXCL10 and CXCL11 (chemoattractant for T-cells) in tumor vessels [19]. Additionally, sunitinib is known to reduce intratumoral content of myeloid-derived suppressor cells in human renal cell carcinoma which can also contribute to increase T-cells there [20]. Altogether, these recent findings suggest that the association between a decrease in lymphocytes count on D21 and a longer PFS could be related to a change in the compartmental distribution of lymphocytes, characterized by a progressive infiltration in tumor tissue and therefore, a better anti-tumor immunity. Further investigations are however warranted to support this hypothesis.

To the best of our knowledge, the present study is the first to show that kinomic profiles of PBMC from naïve mRCC patients would be different from healthy volunteers. Twine *et al.* have however reported disease-associated differences in transcriptome profiles of PBMC from RCC patients compared to PBMC of healthy volunteers [21]. They observed heterogeneity in the expression of these transcripts across RCC patients. Interestingly, we found that the activity of most PTK was lower in PBMC from naïve mRCC patients than those in healthy volunteers. Immune dysfunction has been well documented in RCC patients, especially with the tumor infiltrating T-cells energy [22]. T-cells exhaustion is known to be related in part to the expression of inhibitory molecules such as Programmed Death 1 (PD-1), whose level of expression is enhanced by VEGF-A [23, 24]. A recent study showed that the plasma level of VEGF-A was 3- to 4-fold higher in mRCC patients than in healthy volunteers [25]. Besides, another study documented an increased PD-1 expression on circulating T-cells, NK cells and monocytes from RCC patients [26]. Taken together, these results suggest that the lower PTK activity observed in our mRCC cohort could be related to an increased expression of PD-1 on PBMC. Another explanation may be related to the difference in age between mRCC patients and healthy volunteers (69 vs 50 years old). Indeed, intrinsic "senescence" is known to compromise the activation pathways in lymphocytes from the elderly [27]. Additionally, an increase in the number of PD-1-

expressing T-lymphocytes has been documented in aged mice, which confers to these cells an exhausted phenotype [28]. These different factors could also contribute to the lower PTK activity in our mRCC cohort.

The present study is the first to provide kinome trees of sunitinib and its active metabolite SU12662 for PTK in PBMC from naïve mRCC patients. As expected, our results showed that sunitinib and SU12662 inhibited many PTK. In literature, well-known targets for sunitinib are Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2), PDGFR, kit, Flt-3 and RET [29]. Even though these targets were not the most inhibited in our study, their inhibition validates our approach of using PBMC as a model system. Discrepancies between our sunitinib kinome tree and the documented tree for sunitinib [30] could be explained by the latter being built from the *in vitro* data, which represents sunitinib affinity for purified kinases. Additionally, it does not take into account the PTK expression level in cells. Finally, the present study highlights for the first time a stronger inhibitory effect of sunitinib than SU12662 on shared targets like Zap70, some Src family kinases (Src, Fyn, Yes1) and DDR1, which are respectively involved in lymphocytes activation [31], lymphocytes development [32] and T-cells migration [33]. These results could constitute a first step to decipher these mechanisms in more depth.

The large interindividual variability in sensitivity towards both sunitinib and SU12662 could contribute to the variability in immunomodulatory effects in mRCC patients. Among the different baseline parameters tested, the Heng prognostic score was the single factor of variability identified. Interestingly, sunitinib and SU12662 exhibited less *ex vivo* inhibitory effects in PBMC from mRCC patients with a poor Heng prognostic score. From clinical data, the recent ESMO clinical practice guidelines recommend the use of mTOR inhibitor in first-line treatment of mRCC patients with poor prognosis, while sunitinib remains the golden standard in other patients [34]. Taken together, these results suggest that sunitinib should be less efficient in mRCC patients exhibiting a lower *ex vivo* inhibitory effects of either sunitinib or SU12662 in their PBMC. Additionally, the retrospective study highlights the prognostic value of lymphocytes D21/D0 ratio. Finally, the kinomic analysis has identified a positive relationship between the D21/D0 lymphocytes ratio and the *ex vivo* level inhibition by sunitinib (or SU12662) for some peptides. In this context, these preliminary results pave the way to investigate the kinomic profile in PBMC as a prognostic factor in a larger cohort of mRCC patients under sunitinib therapy.

In conclusion, the present study highlights that D21/D0 total lymphocytes ratio could be a promising pharmacodynamic biomarker in mRCC patients treated with sunitinib in first line. Additionally, our data suggest that the kinomic analysis in PBMC from mRCC patients could be a useful tool to identify good candidates for

sunitinib treatment. Moreover, this first kinomic analysis in PBMC paves the way to seek mechanisms that drive tumor cell to immune escape in mRCC patients under sunitinib.

MATERIALS AND METHODS

Retrospective preliminary study

A retrospective study was conducted in mRCC patients treated with first-line sunitinib therapy from June 2006 to January 2015 in the oncology department of Cochin Hospital in Paris, France. From medical records, baseline clinical and biological parameters were collected. Biological parameters included hematological specifications (haemoglobin, leukocytes, neutrophils, lymphocytes and platelets) before treatment starts (D0) and on day 21 (D21) of the first cycle of treatment. Each one was expressed as a ratio (D21/D0) to reflect their global evolution besides pathological values. Finally, steady-state plasma composite (sunitinib + SU12662) exposure at D21 was recorded.

Patient selection for kinomic profiling

From March 2015 to November 2015, a total of 21 naïve mRCC patients and 12 healthy volunteers were included for the kinomic analysis. The latter was in compliance with the Declaration of Helsinki and approved by the local medical ethical board (N° 316-12). All subjects gave their written informed consent to participate in the study.

Sample collection and lysis

PBMC from healthy volunteers and patients (at D0) were isolated by density-gradient centrifugation in Ficoll. Cells (3.5 million) were lysed in 140 μ l of the mammalian protein extraction (M-PER) reagent (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France), supplemented with 1:100 Halt's phosphatase and protease inhibitors (Thermo Scientific) before centrifugation (12000 rpm, 15 min, 4°C). Aliquots of the supernatant were stored at -80°C. Protein quantification was performed using standard Bradford protein assay (Thermo Scientific). PBMC were used rather than lymphocytes to minimize the influence of FACS sorting on PTK activity.

Kinomic profiling assay

PTK activity profiling was performed using a PamStation®12 (PamGene International B.V.,'s Hertogenbosch, The Netherlands) and PTK PamChip®4

with 4 identical arrays. On each array, 142 tyrosine-containing peptides (13 amino acids long), derived from known human phosphorylation sites, are immobilized.

An assay incubation mixture, containing 2 to 4 μ g of protein (depending on total protein available), 100 μ M ATP and fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled antiphosphotyrosine antibody (PamGene), was added in each array. The mixture was pumped up and down through the porous membrane. Peptide phosphorylation was monitored during the incubation by taking images with a CCD camera in combination with Evolve software v. 1.2 (PamGene) allowing real-time recording of the reaction kinetics. After washing of the arrays, fluorescence was detected at different exposure times (20, 50, 100 and 200 ms).

Kinomic profiles of healthy volunteers and sunitinib-naïve mRCC patients at baseline (D0) were studied by spiking in vehicle (0.1% of dimethyl sulfoxide, DMSO) into the assay incubation mixture and performing the PTK kinomic assay. The *ex vivo* inhibitory effect of sunitinib and SU12662 in mRCC patient lysates was studied by spiking in sunitinib (1 μ M), SU12662 (1 μ M) or DMSO (0.1%) into the assay incubation mixture before performing the PTK kinomic assay.

Statistical analysis

For the retrospective clinical study, descriptive statistics used median [interquartile interval] for quantitative variables and percentages for qualitative ones. Ratio D21/D0 for each hematological parameter was assessed to explore the pharmacodynamic effect of sunitinib on peripheral blood cells. PFS was analyzed in the framework of survival analysis. PFS was estimated with the Kaplan-Meier method. Clinical and biological predictive factors were first assessed using univariate Cox models. Secondly, factors with a p-value lower than 0.10 were entered into a stepwise Cox model regression. The final multivariate Cox model contained the set of factors with a p-value lower than 0.05 by the Wald test. All computations were performed with the SAS V9.3 statistical package (SAS institute Inc., Cary, NC, USA).

For kinomic analysis, image analysis and signal quantification were performed using the BioNavigator® software v. 6.1 (PamGene), whilst data analysis was done using the same software but interfaced with R (Bioconductor). Peptides that showed kinetics (increase in signal intensity in time) were preselected ("QC list") and Log₂-transformed ("Log₂Signal"). Log fold change (LFC) was determined from *ex vivo* inhibitor data (Log₂Signal Inhibitor - Log₂Signal DMSO). *Ex vivo* inhibitor effects were evaluated for each peptide using ANOVA. Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream PTK, which were mapped to a phylogenetic tree of the kinome using the Kinome Renderer tool. Per-peptide differences between Heng prognostic groups were evaluated

using two-tailed *t*-tests and unsupervised multivariate clustering of samples was evaluated with Principal Component Analysis (PCA). For these analyses, data from patients with good prognosis ($n = 2$) were not included in the study as they lacked statistical power. A one-way ANOVA was used to compare the lymphocytes ratio D21/D0 to LFC signal intensity. MetaCore (GeneGo)[™] (Thomson Reuters, U.S.A) was used for pathway and network analysis.

CONFLICTS OF INTEREST

This work was presented at the AACR annual Meeting, 2016.

The PamStation[®]12 was kindly lent by PamGene international. Savithri Rangarajan and Faris Naji are employed by PamGene International. The remaining authors have declared that no conflicts of interests exist.

GRANT SUPPORT

Gaëlle Noé and Audrey Bellesoeur contributed equally to this work

This work was supported by Fondation Martine Midy (BQ1015 to GN).

REFERENCES

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013; 49: 1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
2. Santoni M, Berardi R, Amantini C, Burattini L, Santini D, Santoni G, Cascinu S. Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2014; 134: 2772-7. doi: 10.1002/ijc.28503.
3. Tahiri A, Roe K, Ree AH, Wijn R De, Risberg K, Busch C. Differential Inhibition of Ex-Vivo Tumor Kinase Activity by Vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF Wild-Type Metastatic Malignant Melanoma. *Plos One*. 2013; 8: 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0072692.
4. Sikkema AH, Diks SH, den Dunnen WFA, ter Elst A, Scherpen FJG, Hoving EW, Ruijtenbeek R, Boender PJ, de Wijn R, Kamps WA, Peppelenbosch MP, de Bont ESJM. Kinome profiling in pediatric brain tumors as a new approach for target discovery. *Cancer Res*. 2009; 69: 5987-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3660.
5. Ree AH, Flatmark K, Saelen MG, Folkvord S, Dueland S, Geisler J, Redalen KR. Tumor phosphatidylinositol 3-kinase signaling in therapy resistance and metastatic dissemination of rectal cancer: opportunities for signaling-adapted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015; 95: 114-24. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.01.003.
6. Anderson JC, Minnich DJ, Dobelbower MC, Denton AJ, Dussaq AM, Gilbert AN, Rohrbach TD, Arafat W, Welaya K, Bonner JA, Willey CD. Kinomic profiling of electromagnetic navigational bronchoscopy specimens: a new approach for personalized medicine. *PLoS One*. 2014; 9: e116388. doi: 10.1371/journal.pone.0116388.
7. Folkvord S, Flatmark K, Dueland S, de Wijn R, Groholt KK, Hole KH, Nesland JM, Ruijtenbeek R, Boender PJ, Johansen M, Giercksky K-E, Ree AH. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by multiplex kinase activity profiling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 78: 555-62. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.04.036.
8. Anderson JC, Willey CD, Mehta A, Welaya K, Chen D, Duarte CW, Ghatia P, Arafat W, Madan A, Sudarshan S, Naik G, Grizzle WE, Choueiri TK, et al. High Throughput Kinomic Profiling of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma Identifies Kinase Activity Dependent Molecular Subtypes. *Plos One*. 2015; 10: e0139267. doi: 10.1371/journal.pone.0139267.
9. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11: 215-33. doi: 10.1038/nrd3626.
10. Powles T, Chowdhury S, Bower M, Saunders N, Lim L, Shamash J, Sarwar N, Sadev A, Peters J, Green J, Boleti K, Augwal S. The effect of sunitinib on immune subsets in metastatic clear cell renal cancer. *Urol Int*. 2011; 86: 53-9. doi: 10.1159/000319498.
11. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, Medioni J, Peyrard S, Roncelin S, Verkarre V, Mejean A, Fridman WH, Oudard S, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2010; 33: 991-8. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181f4e208.
12. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2010; 77: 410-9. doi: 10.1002/cyto.a.20859.
13. De Giorgi U, Rihawi K, Aieta M, Lo Re G, Sava T, Masini C, Baldazzi V, De Vincenzo F, Camerini A, Fornarini G, Burattini L, Rosti G, Moschetti L, et al. Lymphopenia and clinical outcome of elderly patients treated with sunitinib for metastatic renal cell cancer. *J Geriatr Oncol Elsevier Inc*. 2014; 5: 156-63. doi: 10.1016/j.jgo.2014.01.001.
14. Chrom P, Stec R, Semeniuk-Wojtas A, Bodnar L, Spencer NJ, Szczylik C. Fuhrman Grade and Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio Influence on Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With First-Line Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin Genitourin Cancer*. 2016; 1-8. doi: 10.1016/j.clgc.2016.02.005.
15. Keizman D, Ish-Shalom M, Huang P, Eisenberger MA,

- Pili R, Hammers H, Carducci MA. The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with response rate, progression free survival and overall survival of patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2012; 48: 202-8. doi: 10.1016/j.ejca.2011.09.001.
16. Templeton AJ, Knox JJ, Lin X, Simantov R, Xie W, Lawrence N, Broom R, Fay AP, Rini B, Donskov F, Bjarnason GA, Smoragiewicz M, Kollmannsberger C, et al. Change in Neutrophil-to-lymphocyte Ratio in Response to Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma as a Prognosticator and Biomarker of Efficacy. *Eur Urol*. 2016; 70: 358-64. doi: 10.1016/j.euro.2016.02.033.
 17. Krusch M, Salih J, Schlicke M, Baessler T, Kampa KM, Mayer F, Salih HR. The kinase inhibitors sunitinib and sorafenib differentially affect NK cell antitumor reactivity *in vitro*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009; 183: 8286-94. doi: 10.4049/jimmunol.0902404.
 18. Guislain A, Gadiot J, Kaiser A, Jordanova ES, Broeks A, Sanders J, van Boven H, de Gruijl TD, Haanen JBAG, Bex A, Blank CU. Sunitinib pretreatment improves tumor-infiltrating lymphocyte expansion by reduction in intratumoral content of myeloid-derived suppressor cells in human renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. Springer Berlin Heidelberg; 2015; 64: 1241-50. doi: 10.1007/s00262-015-1735-z.
 19. Huang H, Langenkamp E, Georganaki M, Loskog A, Fuchs PF, redlund, Dieterich LC, Kreuger J, Dimberg A. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF-KB-induced endothelial activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015; 29: 227-38. doi: 10.1096/fj.14-250985.
 20. Draghiciu O, Nijman HW, Hoogeboom BN, Meijerhof T, Daemen T. Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *Oncol Immunology*. 2015; 4: 1-11. doi: e989764.
 21. Twine NC, Stover JA, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Dorner AJ, Slonim DK, Trepicchio WL, Burczynski ME. Disease-associated Expression Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63: 6069-75.
 22. Noessner E, Brech D, Mandler AN, Masouris I, Schlenker R, Prinz PU. Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8 + T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Immunology*. 2012; 1: 1451-3.
 23. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Lacerda K, Karadimou A, Badoual C, Tedgui A, Fridman WH, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2011; 30: 83-95. doi: 10.1007/s10555-011-9281-4.
 24. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernet S, Nizard M, Pointet A-L, Latreche S, Bergaya S, Benhamouda N, Tanchot C, Stockmann C, Combe P, Berger A, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*. 2015; 212: 139-48. doi: 10.1084/jem.20140559.
 25. Harmon CS, DePrimo SE, Figlin RA, Hudes GR, Hutson TE, Michaelson MD, Négrier S, Kim ST, Huang X, Williams JA, Eisen T, Motzer RJ. Circulating proteins as potential biomarkers of sunitinib and interferon- α efficacy in treatment-naïve patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014; 73: 151-61. doi: 10.1007/s00280-013-2333-4.
 26. MacFarlane AW, Jillab M, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, Dulaimi E, Al-Saleem T, Campbell KS. PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2: 320-31. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0133.
 27. Boraschi D, Aguado MT, Dutel C, Goronzy J, Louis J, Grubeck-Loebenstien B, Rappuoli R, Del Giudice G. The gracefully aging immune system. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 185ps8. doi: 10.1126/scitranslmed.3005624.
 28. Lages CS, Lewkowich I, Sproles A, Wills-Karp M, Choungnet C. Partial restoration of T-cell function in aged mice by *in vitro* blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. *Aging Cell*. 2010; 9: 785-98. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00611.x.
 29. Roskoski R. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356: 323-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.156.
 30. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 127-32. doi: 10.1038/nbt1358.
 31. Gu Y, Zhao W, Meng F, Qu B, Zhu X, Sun Y, Shu Y, Xu Q. Sunitinib impairs the proliferation and function of human peripheral T cell and prevents T-cell-mediated immune response in mice. *Clin Immunol Elsevier Inc*; 2010; 135: 55-62. doi: 10.1016/j.clim.2009.11.013.
 32. Longo NS, Wang X, Wildin RS, Abraham KM. Regulation of Src-family protein tyrosine kinase transcription during lymphocyte ontogeny. *Mol Immunol*. 1999; 36: 979-92.
 33. Chetoui N, El azreq M-A, Boisvert M, Bergeron M-È, Aoudjit F. Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 3666-74. doi: 10.1002/jcb.23300.
 34. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Algaba F, Patard JJ, Khoo V, Eisen T, Horwich A. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and

follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25 suppl 3: iii49-iii56. doi: 10.1093/annonc/ndu259.

35. Chartier M, Chénard T, Barker J, Najmanovich R. Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree. *PeerJ.* 2013; 1: e126. doi: 10.7717/peerj.126.

2 Recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques du nivolumab

2.1 Article 2 : Mise au point et validation du dosage du nivolumab par une technique ELISA

2.1.1 Introduction et objectif

La première partie de cette thèse a permis de souligner la nécessité d'identifier un biomarqueur chez les patients traités par nivolumab. En effet, la variabilité interindividuelle de réponse au nivolumab rapportée chez les patients atteints le cancer bronchique non-à-petites cellules (CBNPC) se traduit d'une part, par une variabilité de l'efficacité avec un taux de réponse objective seulement de 20 % et d'autre part, par une variabilité en terme de toxicité.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à ces différences, notamment la pharmacocinétique du nivolumab. Ainsi, une variabilité de la clairance du nivolumab d'environ 50 % a été décrite. De ce fait, la variabilité interindividuelle de l'exposition plasmatique au nivolumab pourrait contribuer à la variabilité clinique observée. Afin de mieux comprendre par la suite les facteurs de variabilité des profil kinomiques de patients atteints de CBNPC et traités par nivolumab, il était donc indispensable de déterminer l'exposition plasmatique au nivolumab chez ces patients.

Récemment, une méthode de dosage du nivolumab par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse utilisant la protéolyse nSMOL (*nano-surface and molecuraorientation*) a été décrite³¹¹. Cependant, elle n'a pas été appliquée sur du plasma de patients atteints de cancer et traités par nivolumab, ce qui représente un facteur limitant à son application en recherche clinique. De plus, la technique décrite est actuellement difficilement réalisable au sein de laboratoires hospitaliers.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de développer puis de valider une méthode de dosage plasmatique du nivolumab par une technique ELISA sandwich dans le but de déterminer ultérieurement la concentration plasmatique de nivolumab des patients CBNPC inclus dans

l'étude évaluant l'intérêt du profil kinomique des CMSP comme biomarqueur (travail n°3 de la thèse).

2.1.2 Matériels et méthodes

Le dosage plasmatique du nivolumab a été réalisé par une technique ELISA sandwich. Le premier jour, une solution de PD-1 recombinant humain (100 µg/mL, reconstitué dans du PBS) est incubée à 4°C sur des plaques 96 puits « *high-binding* » durant une nuit complète. Le deuxième jour, 4 lavages sont effectués à l'aide de 360 µL de tampon de lavage (PBS contenant 0,05 % de tween 20). Par la suite, un blocage non-spécifique est effectué en ajoutant dans chaque puits 200 µL d'un tampon de blocage (PBS contenant 2 % de BSA (*bovine saline albumine*)) et en incubant la plaque à 37°C pendant 2 heures. Cent µL de solutions (gamme, contrôles, patients) contenant le nivolumab diluées au 4000^{ème} dans du tampon de blocage, sont ensuite déposées en duplicate et incubées sur la plaque pendant 2 heures à 37°C. Après 4 lavages de la plaque, 100 µL d'anticorps secondaire anti-IgG4 (anti Fc) conjugué à de la phosphatase alcaline, sont déposés et incubés toute la nuit à 4°C. Le troisième jour, la plaque est lavée avant d'ajouter 200 µL de substrat PNPP (p-nitrophenyl phosphate) dans chaque puits. La plaque est laissée 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière puis la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 50 µL d'une solution de NaOH (3N). Enfin, la lecture des densités optiques est effectuée par un spectrophotomètre à 405 nm.

Pour quantifier la concentration plasmatique de nivolumab chez les patients, une gamme d'étalonnage composée de 7 points de gamme (5 ; 10 ; 25 ; 37,5 ; 50 ; 75 et 100 µg/mL) a été préparée dans du plasma synthétique. La justesse de la gamme a été validée à partir de 3 contrôles de qualité interne (CQ) (5 ; 20 et 75 µg/mL). La méthode analytique a été validée selon les recommandations actuelles de la *Food Drug Administration* (FDA) et l'*European Medicines agency* (EMA). Ainsi, des paramètres tels que la répétabilité, la reproductibilité et le parallélisme de la méthode ont été évalués.

Afin de s'assurer de la validité du dosage en pratique clinique, des prélèvements sanguins de patients atteints de CBNPC traités par nivolumab (3 mg/kg toutes les 2 semaines) ont été collectés. Les prélèvements ont été réalisés juste avant la première injection de nivolumab et en résiduelle de la première, deuxième et troisième injection (J14, J28 et J42, respectivement). Enfin,

la recherche de facteurs contribuant à la variabilité interindividuelle de la concentration plasmatique résiduelle (C_{\min}) à J42 a été réalisée par régression linéaire multiple.

2.1.3 Résultats

La densité optique est dépendante de la concentration plasmatique de nivolumab sur une gamme qui s'étend de 5 à 100 $\mu\text{g/mL}$ de nivolumab. Aucun bruit de fond significatif n'a été observé avec le plasma synthétique. La limite de quantification inférieure a été déterminée à 3 $\mu\text{g/mL}$ à partir de plasma de patients atteints de CBNPC non traités par nivolumab. Aucune interférence endogène n'a été observée dans le plasma des 27 patients atteints de CBNPC. Les exactitudes intra- et inter-jours évaluées à partir des 3 CQI variaient entre -7,5 et 0,6 % et entre -1,3 et 3,5 %, respectivement. Les précisions intra- et inter-jours étaient respectivement inférieures à 5 et 12 %. Les essais de parallélisme, consistant à diluer le plasma de patient au $\frac{1}{2}$ dans le plasma synthétique, ont été réalisés sur 5 échantillons de patients présentant une concentration plasmatique en nivolumab supérieure à 100 $\mu\text{g/mL}$. Le coefficient de variation (CV) ainsi que le biais étaient alors de ± 10 %, confirmant que cette méthode est utilisable également pour le dosage de nivolumab au moment du pic plasmatique. La valeur au pic étant de 124 $\mu\text{g/mL}$ (CV=31,8 %) lorsque l'équilibre est atteint, selon de rapport de l'EMA.

Vingt sept patients atteints de CBNPC traités par nivolumab ont été inclus dans cette étude, L'âge médian était de 68 ans [65-70] et le rapport femme/homme de 1,25. Cinquante six pour cent des tumeurs étaient des adénocarcinomes. Les patients ont reçu une dose moyenne de nivolumab de 207 mg (extrêmes : 147 et 288 mg). Les C_{\min} plasmatiques moyennes (\pm écart type) étaient de $17,3 \pm 4,8$ $\mu\text{g/mL}$ (CV=27,8 %), $25,0 \pm 9,7$ $\mu\text{g/mL}$ (CV=38,8 %) and $33,0 \pm 12,9$ $\mu\text{g/mL}$ (CV=39,1 %) après 14, 28 et 42 jours de traitement, respectivement. Une variation significative de la C_{\min} de nivolumab été observée aux différentes occasions de prélèvement (test ANOVA, $p < 0,001$). Ainsi la C_{\min} moyenne de nivolumab était statistiquement plus élevée à J42 qu'aux jours 14 et 28 ($p < 0,0001$ et $p = 0,019$, respectivement), suggérant que l'état d'équilibre pharmacocinétique n'était pas encore atteint après 42 jours de traitement. Enfin, l'analyse multivariée a identifié le taux d'IgG ($p = 0,002$) et d'ALAT ($p = 0,041$) comme facteurs indépendants de la variabilité interindividuelle de C_{\min} à J42.

2.1.4 Discussion

Ces données démontrent la répétabilité ainsi que la reproductibilité de cette méthode analytique. Par ailleurs, cette dernière s'est également révélée être spécifique vis-à-vis du nivolumab, suite à des tests qui n'ont montré aucune interférence avec le tampon de blocage.

La matrice choisie pour la mise au point de cette méthode était du plasma synthétique. Les signaux obtenus dans les échantillons plasmatiques des 27 patients avant l'initiation du nivolumab ou dans le plasma synthétique ne diffèrent pas de façon significative, confirmant qu'il n'y a pas d'interférence avec cette matrice. Nous avons choisi d'utiliser ce plasma synthétique comme matrice pour la préparation des solutions de la gamme et des solutions contrôles.

Cette étude rapporte une variabilité interindividuelle modérée, ce qui est en accord avec les résultats rapportés dans le rapport d'évaluation soumis à l'EMA ²⁷⁰. En revanche, les facteurs de variabilité identifiés dans notre étude (IgG, ALAT) sont discordants avec ceux précédemment décrits. Dans le rapport d'évaluation soumis à l'EMA, l'albumine et le poids ont été identifiés comme des covariables significatives de la clairance du nivolumab à l'état d'équilibre. Nos résultats doivent être interprétés avec précautions puisqu'ils ne portent que sur une petite population comprenant 27 patients. De plus, les analyses statistiques ont été effectuées à J42 et non pas à l'état d'équilibre. Enfin, la régression linéaire multiple utilisée dans notre étude est beaucoup moins puissante que l'approche de population habituellement employée pour identifier les sources de variabilités pharmacocinétiques.

A notre connaissance, ce travail décrit pour la première fois une méthode de dosage du nivolumab par ELISA sandwich chez des patients ambulatoires atteints de CBNPC traités par nivolumab. La validation analytique a montré la justesse et la robustesse de notre méthode de dosage. Par ailleurs, les résultats pharmacocinétiques de cette étude mettent en évidence une variabilité interindividuelle modérée d'exposition plasmatique au nivolumab qui pourrait être une source de la variabilité de la réponse clinique. Au final, cette méthode de dosage pourra donc être utilisée dans le cadre de l'étude N°3 afin de déterminer l'influence de l'exposition plasmatique au nivolumab sur le profil cinétique de patients CBNPC.

Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission à *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, intitulée : « Development and validation of ELISA for the quantification of nivolumab in plasma from non-small-cell lung cancer patients ». A Puzkiel, G Noé, P Boudou-Rouquette, C Le Cossec, J Arrondeau, JS Giraud, A Thomas-Schoemann, J Alexandre, M Vidal, F Goldwasser, B Blanchet.

Development and validation of ELISA for the quantification of nivolumab in plasma from non-small-cell lung cancer patients

Alicja Puszkiel¹, Gaëlle Noé^{1,2}, Pascaline Boudou-Rouquette^{3,4}, Chloé Le Cossec⁵, Jennifer Arrondeau^{3,4}, Jean-Stephane Giraud¹, Audrey Thomas-Schoemann^{1,2,4}, Jérôme Alexandre^{3,4,6}, Michel Vidal^{1,2,4}, François Goldwasser^{3,4,6}, Benoit Blanchet^{*,1,4}

¹ Department of Pharmacokinetics and Pharmacochimistry, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France;

² UMR8638 CNRS, UFR de Pharmacie, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France;

³ Department of Medical Oncology, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; Université Paris Descartes, CARPEM, Paris, France;

⁴ Immunomodulatory Therapies Multidisciplinary Study group (CERTIM), Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France;

⁵ Directorate of medical organization, APHP, France,

⁶ U1016 INSERM, UMR 8104 CNRS, UMR-S1016, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

***Corresponding author:**

B. Blanchet, PharmD, PhD

Department of Pharmacokinetics and Pharmacochimistry, Hôpital Cochin

27 rue du Faubourg Saint Jacques

75014 Paris, France

Tel: + 33 1 58 41 23 13, Fax: + 33 1 58 41 23 15

Email: benoit.blanchet@aphp.fr

Abstract

Nivolumab, an anti PD-1 monoclonal antibody, has been approved for the treatment of previously treated advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC). The aim of this study was to develop and validate an ELISA method for the quantification of nivolumab in plasma from patients with NSCLC in order to conduct future pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) studies. A home-made ELISA was developed and validated according to the general recommendations for the immunoassays. Then, ELISA method was applied to quantify plasma trough levels (C_{\min}) of nivolumab (3 mg/kg every two weeks) in 27 NSCLC patients at days 14, 28 and 42 after the treatment start. Blood samples were collected just before the infusion on days 0 (baseline), 14, 28 and 42 after treatment start. The calibration for nivolumab assay ranged from 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$. Within- and between-day imprecision for internal quality controls (5, 20 and 75 $\mu\text{g/mL}$) were less than 5 and 12%, respectively. The mean (\pm standard deviation) nivolumab C_{\min} was 17.3 ± 4.8 $\mu\text{g/mL}$ (coefficient of variation, CV = 27.8%), 25.0 ± 9.7 $\mu\text{g/mL}$ (CV = 38.8%) and 33.0 ± 12.9 $\mu\text{g/mL}$ (CV = 39.1%) on days 14, 28 and 42, respectively. IgG ($p = 0.002$) and ALT ($p = 0.041$) were independently associated with plasma nivolumab C_{\min} at day 42. The present ELISA method for nivolumab quantification in plasma from NSCLC patients is enough sensitive and accurate to be used for further PK/PD investigations.

Highlights

This study describes a sensitive and accurate ELISA method for quantification of nivolumab in human plasma.

Plasma concentration of nivolumab was assayed in non-small-cell lung cancer patients.

The assay is applicable to investigate pharmacokinetics of nivolumab and its PK/PD relationship.

Keywords: nivolumab, anti PD-1 monoclonal antibody, non-small-cell-lung cancer, immunoassay, pharmacokinetics.

Abbreviations

ALP, Alkaline Phosphatase; ALT, alanine transaminase; BSA, Bovine Serum Albumin; CV, Coefficient of Variation; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration; HLOQ, Higher Limit of Quantification; IgG4, Immunoglobulin G4; IQC, Internal Quality Control; LLOQ, LC/MS, liquid chromatography-mass spectrometry; Lower Limit of Quantification; NSCLC, Non-Small-Cell Lung Cancer; nSMOL, nano-surface and molecular-orientation limited; OD, Optical Density; PBS, Phosphate-Buffered Saline; PD-1, Programmed cell Death-1; PD-L1, Programmed cell Death-ligand 1; PK/PD, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic; SD, Standard Deviation.

1 Introduction

Antibody therapy directed against several negative immunological regulators (checkpoints) demonstrates significant success and is likely to be a major component of treatment for patients with a variety of malignancies. Programmed death receptor-1 (PD-1), an immune checkpoint, is expressed on many immunological cells such as T cells, B cells and natural killers [1]. PD-1 exerts its inhibitory activity during the effector phase of T cell activation in the tumor microenvironment [2]. Since about 10 years, targeting PD-1 appears as a promising therapeutic approach for immunological cancers. Nivolumab is a fully human monoclonal immunoglobulin G4 (IgG4) that targets PD-1 and blocks its binding to PD-ligand 1 (PD-L1) and PD-ligand 2 (PD-L2). Different phase III clinical trials demonstrated a durable clinical response with nivolumab in previously untreated patients with metastatic melanoma [3], previously treated advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) [4,5] or advanced renal cell carcinoma previously treated with antiangiogenic therapy [6]. Nivolumab (3 mg/kg, every two weeks) is approved for the treatment of metastatic melanoma, advanced squamous or non-squamous non-small-cell lung cancer.

The rate of objective response is about 20% in NSCLC patients treated with nivolumab [7]. Besides, a large interindividual variability in clinical outcomes (efficacy, toxicity) is observed in those patients. Different characteristics such as disease stage, tumor characteristics and the level of PD-L1 expression on tumor cells can contribute to this clinical variability. Nivolumab exhibits a moderate to large interindividual variability in its pharmacokinetics parameters, especially for its systemic clearance with a variability of about 50% [8]. Different studies have recently reported PK/PD relationship for therapeutic monoclonal antibodies (mabs) used for the treatment of solid and liquid tumors [9-11] suggesting the benefit of therapeutic drug monitoring of these therapies in daily clinical practice. Regarding nivolumab, the assessment report for European Medicines Agency (EMA) does not document any PK/PD relationship in NSCLC patients [8]. However, further PK/PD investigations are

required especially in « real life » patients to optimize both nivolumab therapy and its cost in daily clinical practice. In this context, development of a specific, sensitive and accurate analytical method for determination of nivolumab in human plasma is a mandatory step before exploring its PK/PD relationship. Recently, Iwamoto et al. reported a liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method to assay nivolumab in plasma using the nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis [12]. However, this method was not validated in plasma from cancer patients treated with nivolumab and therefore cannot be used in PK/PD studies without this mandatory step. Finally, the nSMOL proteolysis is not available in most of the hospital laboratories. In this context, we aimed to develop and validate an ELISA method to assay nivolumab concentration in plasma from NSCLC patients.

2 Materials and methods

2.1 Reagents

Nivolumab (Opdivo[®], 10 mg/mL) was kindly supplied by the hospital pharmacy. Nivolumab was aliquoted and stored at -80°C , and the dilutions were freshly prepared using phosphate-buffered saline (PBS) immediately before use. Recombinant PD-1/Fc chimera was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), alkaline phosphatase (ALP) conjugated mouse anti-human IgG4 Fc antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Drug-free plasma for calibration standards and Internal Quality Controls (IQC) was purchased from UTAK laboratories (Valencia, Spain). Corning[®] Costar[®] 96-well high-binding microtiter plate, PBS, Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, sodium chloride, concentrated hydrochloric acid and Tween 20 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). *p*-nitrophenyl phosphate was purchased from Euromedex France (Souffelweyersheim, France). Diethanolamine used to prepare the substrate buffer was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

2.2 Calibration standards

Separate calibration and quality control stock solutions were used. Each day, working solutions of nivolumab (250 $\mu\text{g/mL}$) were freshly prepared in drug-free serum. Seven calibration standards (5, 10, 25, 37.5, 50, 75 and 100 $\mu\text{g/mL}$) and three concentration levels for IQC (5, 20 and 75 $\mu\text{g/mL}$) were also freshly prepared in drug-free plasma.

2.3 Nivolumab ELISA assay

Flat-bottom 96-well high-binding microtiter plate was coated with human recombinant PD-1/Fc (100 $\mu\text{g/mL}$ in PBS), then incubated overnight at 4°C in a cold room. The next day, the plate was washed four times with 360 μL of washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and blocked using 200 μL of blocking buffer (PBS containing 1% BSA) for 2 h at 37°C . Then, blocking buffer was removed from the plate and replaced with 100 μL of a 1:4000 dilution of each sample (calibration standards,

IQC and patient samples) in blocking buffer added in duplicate and the plate was incubated for 2 h at 37°C. After washing the plate four times (PBS containing 0.05% Tween 20), 100 µL of 1:1000 dilution of ALP conjugated mouse anti-human antibody in blocking buffer were added to each well; then the plate was incubated overnight at 4°C. The next day, the plate was washed four times (PBS containing 0.05% Tween 20) before adding 200 µL of *p*-nitrophenyl phosphate in each well. The plate was then incubated in a dark place at room temperature for 30 min. The reaction was stopped by adding 50 µL of NaOH (3N). Plate was read at 405 nm with reference set to 620 nm by using a Asys Expert Plus microplate reader (Biochrom, Cambridge, United Kingdom).

2.4 Method validation

A detailed validation of the ELISA method was performed in accordance with current recommendations for bioanalytical method validation [13,14]. The stability of nivolumab in plasma was not evaluated because Iwamoto et al. recently documented data about this topic [12].

2.4.1 Matrix selection

This method was developed to quantify nivolumab in plasma of NSCLC patients; therefore human drug-free plasma was chosen as matrix for calibrator standards and IQC samples. Plasma from NSCLC patients who did not receive nivolumab was compared to drug-free plasma in order to ensure that the results would not be affected by endogenous components present in NSCLC patient plasma. Control plasma sample (blank plasma) was analyzed during each experiment.

2.4.2 Linearity and calibration curve

Linearity of the method was determined by replicate analysis of seven complete standard curves on separate days. The linearity was assessed by a Power equation ($y=cx^b$) in which the signal (optical density, OD) was plotted against nivolumab concentration. The curve was accepted if back-fitted results for at least 6 calibration standards were comprised within 20% of the theoretical concentration.

2.4.3 Imprecision and accuracy

Imprecision and accuracy were determined by analyzing IQC samples prepared at three concentration levels (5, 20 and 75 µg/mL, respectively). Fifteen replicates of each level were assayed in one run for the within-day experiment. Six replicates of each level were assayed within eleven different experiments to assess the between-assay variability. Imprecision was expressed as coefficient of variation (CV%). Accuracy was determined as difference (%) between measured and theoretical concentration. For within-day and between-day imprecision and accuracy, the acceptance criteria included accuracy of no more than 20% deviation from the theoretical value and imprecision ≤20%. The lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration that could be quantified with imprecision and accuracy which should not exceed 25%.

2.4.4 Dilution integrity and parallelism

Dilution integrity experiment was conducted with four replicates of blank plasma spiked with 150 µg/mL of nivolumab (1.5-fold upper limit of quantification, ULOQ). This sample was serially diluted in drug-free plasma (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16) with the resulting concentrations covering the calibration range. The samples were then diluted by 1:4000 in blocking buffer; then the rest of the protocol was performed as described before (Section 2.3). The accuracy and imprecision for each dilution factor should be within ± 15%.

To evaluate parallelism, blood samples from 10 NSCLC outpatients were collected one hour after the end of perfusion at day 42 after treatment start. The measured concentrations without any dilution were close to or above the ULOQ (108.3 ± 25.7 µg/mL). The samples were serially diluted in drug-free plasma (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16) followed by a 1:4000 dilution in blocking buffer. The lowest dilution that resulted in a measured concentration included in the calibration range was reported as the determined concentration if the CV between the preceding dilution was <20%.

2.5 Clinical sample analysis

The assay was applied to measure plasma concentrations of nivolumab in NSCLC outpatients treated in Oncology Department of Cochin University Hospital. All the outpatients received nivolumab at the recommended dose of 3 mg/kg every two weeks. Blood samples were collected into 5 ml lithium heparinized Vacutainer tubes just before the next administration of nivolumab at days 0 (baseline), 14, 28 and 42 after the treatment initiation. Patient samples were centrifuged ($3082 \times g$, 10 min, 4° C) within 2 hours after collection; then plasma was transferred to propylene tubes and stored -20°C until analysis. This study was approved by the local Review Board for Oncology.

2.6 Statistical Analysis

Continuous data were summarized using median [interquartile range] or mean \pm standard deviation. Categorical data were summarized by frequency counts and percentages. Evolution of nivolumab C_{\min} over the time was analyzed using repeated measure ANOVAs, followed by Tukey's tests for pairwise comparisons when the global test was significant. Regarding associations between plasma nivolumab C_{\min} at day 42 and demographical and biological (at day 42) parameters univariate analyses were inferred using the Spearman correlation test for continuous variables and the Mann-Whitney U-test for categorical variables. Variables that showed a significance of $p < 0.1$ in the univariate analysis were selected for inclusion in the multiple linear regression model. All the results from the multivariate analysis with $p < 0.05$ were considered significant. Statistical analysis was performed using R version 3.2.4 (r-project.org).

3 Results and discussion

3.1 Assay development

3.1.1 Matrix selection

No significant interference was observed in blank with drug-free plasma used for the preparation of calibration standards. Additionally, no significant interference from endogenous compounds was observed in pre-treatment plasma from 27 NSCLC patients, metastatic melanoma patients (n = 10) or metastatic renal carcinoma patients (n = 10).

3.1.2 Specificity of interaction between human recombinant PD-1 and nivolumab

First, the specificity of interaction between human recombinant PD-1 and nivolumab was tested. PD-1 at 100 µg/mL was coated on a plate and incubated overnight at 4°C. The next day, after 2 h incubation with blocking buffer as described in Section 2.3, half of the plate was incubated with samples containing nivolumab (control wells) and the second half with blocking buffer (PBS containing 1% BSA). The rest of the protocol was performed as described before (Section 2.3). After addition of *p*-nitrophenyl phosphate into each well there was no signal (OD) detected in the wells where nivolumab was not added (data not shown). It assured that the signal detected after addition of substrate to the plate comes from the specific binding of nivolumab from patient samples to PD-1 coated on the plate.

3.1.3 Dynamic range and linearity

In order to establish the dynamic range of the assay, eleven calibration standards were prepared by serial 1 in 2 dilutions of concentrated nivolumab sample (200 µg/mL) in drug-free plasma resulting in a wide range of concentrations (100 ng/mL – 200 µg/mL). These solutions were then diluted by 1:1000, 1:2000 and 1:4000 in blocking buffer. One calibration curve was plotted for each dilution factor (Figure 1). The best fit was obtained for 1:4000 diluted samples and this dilution factor was

chosen for further development. The calibration range was set to 5 – 100 µg/mL. The upper limit of quantification was set to 100 µg/mL because its signal (OD) did not exceed 2.0 value.

3.2 Assay validation

3.2.1 Linearity and calibration curve

The linearity was evaluated by analysis of seven calibration standards in the range 5 – 100 µg/mL prepared in drug-free plasma and diluted 1:4000 in blocking buffer prior to analysis. The response (OD) versus nivolumab concentration was fit using a Power equation ($y=cx^b$) with the mean \pm SD $y=0.034\pm 0.007x^{0.876\pm 0.041}$ and the goodness of fit was indicated by an average correlation coefficient of 0.996 as a mean from eleven experiments. A typical standard curve of nivolumab in drug-free plasma is shown in Figure 2.

3.2.2 Lower limit of quantification

LLOQ was defined as equivalent to mean (\pm 3SD) apparent plasma concentration in plasma from NSCLC patients who did not receive nivolumab. The mean apparent plasma concentration was 0.74 ± 0.79 µg/mL in pre-treatment plasma from 27 NSCLC patients; therefore LLOQ was set at 3.0 µg/mL. This value is 5-fold higher than the LLOQ recently reported with the LC/MS method to assay nivolumab in human plasma [12]. However, the mean serum predose concentration (C_{min}) of nivolumab expected in NSCLC patients treated with 3 mg/kg is 17.9 ± 5.6 µg/mL after a single administration and 59.9 ± 25.1 µg/mL at steady-state [8]. In the present study, the mean plasma C_{min} (n = 27 samples) after a single administration (day 14) was 17.3 ± 4.8 µg/mL. In addition, all the patient samples analyzed at day 14 were included within the calibration range. Taken together, these results demonstrate that our method is sensitive enough to assay nivolumab C_{min} in plasma from NSCLC patients.

3.2.3 Imprecision and accuracy

Table 1 summarizes the results of within- and between-day accuracy (bias) and imprecision for IQC samples (5, 20 and 75 µg/mL). The within- and between-day bias ranged from -7.5% to 0.6% and from -1.3% to 3.5%, respectively; the imprecision was less than 5 and 12%, respectively. Taken together, these values of accuracy and imprecision prove both the reliability and the reproducibility of the method.

3.2.4 Dilution integrity and parallelism

Table 2 presents the results of dilution integrity experiment. The accuracy and imprecision for each dilution factor were within $\pm 15\%$ regardless the dilution factor. These results suggest that there was no interference of dilution on nivolumab concentration. Finally, 10 plasma samples included in the parallelism experiment required at least 1:2 dilution and met FDA recommendations. The assessment report of nivolumab for EMA documented at steady-state a mean peak serum concentration of 124.0 µg/mL (CV = 31.8%) in NSCLC patients (n = 405) [8], which suggests that the present method could be used to accurately assay peak serum concentration of nivolumab at steady-state.

3.3 Clinical study

Twenty-seven adult NSCLC outpatients were enrolled. Clinical and biological baseline characteristics of the cohort are summarized in Table 3. The median age in the cohort was 68 [65-70] years old and the sex ratio (F/M) was 1.25. The most common histology type was adenocarcinoma (56%). The median dose of nivolumab was 207 mg (range 147 – 288). Overall, plasma predose concentrations (C_{\min}) of nivolumab were assayed in 72 samples. The mean plasma nivolumab C_{\min} was 17.3 ± 4.8 µg/mL (CV = 27.8%), 25.0 ± 9.7 µg/mL (CV = 38.8%) and 33.0 ± 12.9 µg/mL (CV = 39.1%) on days 14, 28 and 42, respectively (Figure 3). A significant variation in nivolumab C_{\min} was observed over time ($p < 0.001$). The mean plasma nivolumab C_{\min} was statistically higher at day 42 than at days 14 and 28 ($p < 0.0001$ and $p = 0.019$, respectively), which suggests that the pharmacokinetic steady-state was not completely achieved at day 42. The elimination half-life of nivolumab is 26 days (CV =

101%) and the pharmacokinetic steady-state concentrations are reached by 12 weeks after treatment start [15]. The assessment report of nivolumab for EMA documented a mean serum C_{\min} of 17.9 $\mu\text{g/mL}$ (CV = 31.3%) after a single administration of nivolumab (dose of 3 mg/kg) in 405 NSCLC patients [8], which is in accordance with our results at day 14 after treatment start. The median serum C_{\min} at steady-state was 59.9 $\mu\text{g/mL}$ (CV = 41.9%) in the EMA report. However, this result cannot be compared with the mean plasma C_{\min} at day 42 reported in this study because we consider that this concentration does not reflect the steady-state.

In the present study, the interindividual variability in plasma C_{\min} was moderate regardless the sampling occasion. This result is in agreement with the results previously reported in the EMA assessment report [8]. Regarding parameters influencing plasma nivolumab exposure, the multivariate analysis showed that IgG ($p = 0.002$) and ALT ($p = 0.041$) were independently associated with plasma nivolumab C_{\min} at day 42 (Table 4). These results are in discordance with those previously reported by population approach in EMA assessment report, in which baseline serum albumin and body weight were documented as significant covariates on nivolumab clearance at steady-state [8]. Our results should be interpreted with caution for different reasons. Firstly, the number of NSCLC outpatients included in our study was low ($n = 27$). Secondly, the statistical analysis was conducted at day 42 while the pharmacokinetic steady-state was not achieved. Finally, the multiple regression is a less powerful tool than the population approach to identify sources of pharmacokinetic variability. Further investigations are therefore warranted to identify significant covariates on nivolumab C_{\min} in plasma from adult NSCLC outpatients.

4 Conclusions

Here, we describe for the first time a validated ELISA method to assay nivolumab concentration in human plasma from cancer patients. This method was successfully applied to 27 adult NSCLC outpatients. Our results highlight a moderate interindividual variability in plasma nivolumab exposure which could be a source of clinical variability (efficacy, toxicity) in NSCLC patients treated with nivolumab. The use of present ELISA method in future PK/PD investigation could be helpful to address this issue.

5 Conflict of interest

This work was presented at the ESMO congress, 2016.

The remaining authors have declared that no conflicts of interests exist.

6 References

- [1] A. Sehgal, T.L. Whiteside, M. Boyiadzis, Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia, *Expert Opin. Biol. Ther.* 15 (2015) 1191–1203.
doi:10.1517/14712598.2015.1051028.
- [2] H. Dong, S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, L. Chen, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion, *Nat. Med.* 8 (2002) 793–800.
doi:10.1038/nm730.
- [3] C. Robert, G.V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbé, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I.M. Waxman, V. Atkinson, P.A. Ascierto, Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 320–330.
doi:10.1056/NEJMoa1412082.
- [4] H. Borghaei, L. Paz-Ares, L. Horn, D.R. Spigel, M. Steins, N.E. Ready, L.Q. Chow, E.E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhäufel, O. Arrieta, M.A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D.E. Gerber, S.N. Gettinger, C.M. Rudin, N. Rizvi, L. Crinò, G.R. Blumenschein, S.J. Antonia, C. Dorange, C.T. Harbison, F. Graf Finckenstein, J.R. Brahmer, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1627–1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643.
- [5] J. Brahmer, K.L. Reckamp, P. Baas, L. Crinò, W.E.E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E.E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Arén Frontera, L. Havel, M. Steins, M.C. Garassino, J.G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudelet, C.T. Harbison, B. Lestini, D.R. Spigel, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 123–135.
doi:10.1056/NEJMoa1504627.
- [6] R.J. Motzer, B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas, S.S. Tykodi, J.A. Sosman, G. Procopio, E.R. Plimack, D. Castellano, T.K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P.

- Bono, J. Wagstaff, T.C. Gauler, T. Ueda, Y. Tomita, F.A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J.S. Simon, L.-A. Xu, I.M. Waxman, P. Sharma, CheckMate 025 Investigators, Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1803–1813. doi:10.1056/NEJMoa1510665.
- [7] G. Zago, M. Muller, M. van den Heuvel, P. Baas, New targeted treatments for non-small-cell lung cancer - role of nivolumab, *Biol. Targets Ther.* 10 (2016) 103–117. doi:10.2147/BTT.S87878.
- [8] Opdivo, INN - nivolumab - WC500205973.pdf, (n.d).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/003985/WC500205973.pdf (accessed October 3, 2016).
- [9] N. Azzopardi, T. Lecomte, D. Ternant, M. Boisdrion-Celle, F. Piller, A. Morel, V. Gouilleux-Gruart, C. Vignault-Desvignes, H. Watier, E. Gamelin, G. Paintaud, Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17 (2011) 6329–6337. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1081.
- [10] Y. Pointreau, N. Azzopardi, D. Ternant, G. Calais, G. Paintaud, Cetuximab Pharmacokinetics Influences Overall Survival in Patients With Head and Neck Cancer, *Ther. Drug Monit.* 38 (2016) 567–572. doi:10.1097/FTD.0000000000000321.
- [11] M. Caulet, T. Lecomte, O. Bouché, J. Rollin, V. Gouilleux-Gruart, N. Azzopardi, J. Léger, C. Borg, J.-Y. Douillard, S. Manfredi, D. Smith, O. Capitain, A. Ferru, D. Moussata, E. Terrebone, G. Paintaud, D. Ternant, Bevacizumab Pharmacokinetics Influence Overall and Progression-Free Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients, *Clin. Pharmacokinet.* (2016). doi:10.1007/s40262-016-0406-3.
- [12] N. Iwamoto, T. Shimada, H. Terakado, A. Hamada, Validated LC-MS/MS analysis of immune checkpoint inhibitor Nivolumab in human plasma using a Fab peptide-selective quantitation method: nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1023–1024 (2016) 9–16. doi:10.1016/j.jchromb.2016.04.038.
- [13] B. DeSilva, W. Smith, R. Weiner, M. Kelley, J. Smolec, B. Lee, M. Khan, R. Tacey, H. Hill, A. Celniker, Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1885–1900.

[14] 4252fnl.PDF - ucm070107.pdf, (n.d.).

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> (accessed October 3, 2016).

[15] OPDIVO (nivolumab) injection Label - 125554lbl.pdf, (n.d.).

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125554lbl.pdf (accessed October 5, 2016).

Figure legends

Figure 1. Calibration curves for three dilution factors

Figure 2. Representative calibration curve for quantification of nivolumab in drug-free plasma

Figure 3. Evolution of plasma predose nivolumab concentrations over time in 27 Non-Small Cell Lung Cancer treated with nivolumab (3mg/kg).

The central box represents the values from the lower to upper quartile (25 to 75 percentile). The middle line represents the median. The horizontal line extends from the minimum to the maximum value, excluding "outside" and "far out" values which are displayed as separate points.

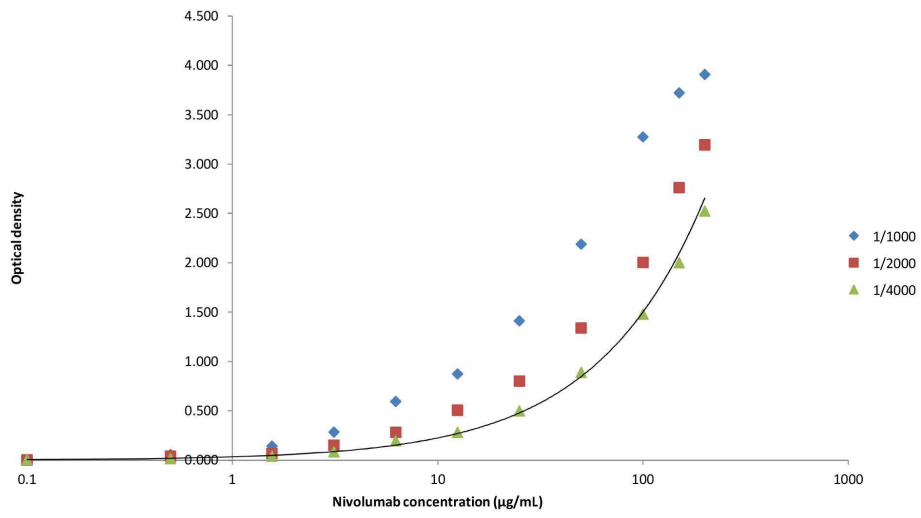


Figure 1. Calibration curves for three dilution factors

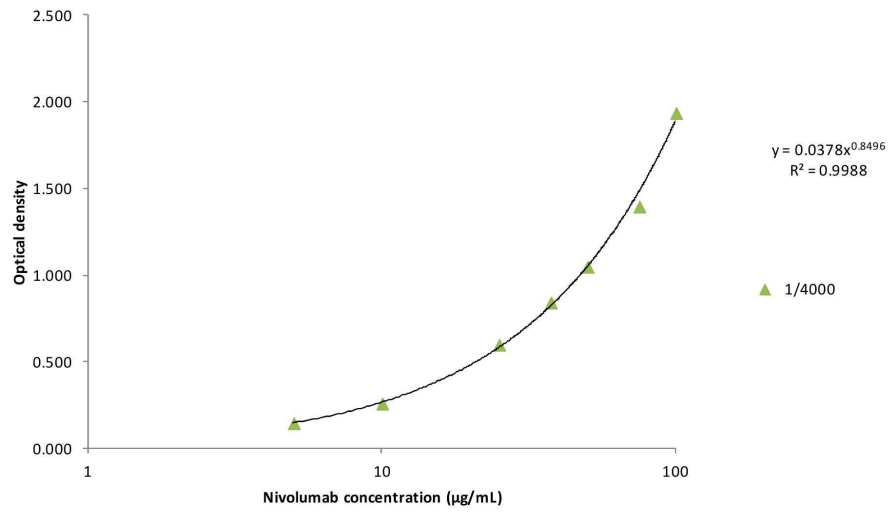


Figure 2. Representative calibration curve for quantification of nivolumab in drug-free plasma

Figure 3. Evolution of plasma predose nivolumab concentrations over time in 27 Non-Small Cell Lung Cancer treated with nivolumab (3mg/kg).

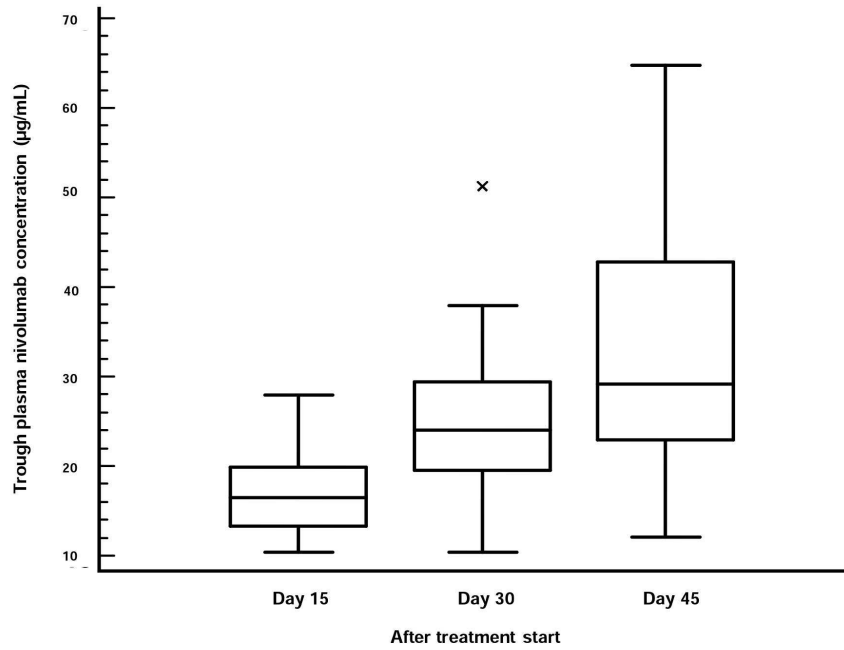


Table 1. Imprecision and accuracy of nivolumab determination in drug-free plasma

	Theoretical (µg/mL)	Measured (µg/mL)	Accuracy* (%)	Imprecision (%)
Between-day (n = 66)	5	5.0	-0.5	12.0
	20	20.7	3.5	8.5
	75	74.1	-1.3	5.6
Within-day (n = 15)	5	5.0	0.6	4.7
	20	19.7	-1.3	4.4
	75	69.4	-7.5	0.7

*Accuracy is expressed as bias (% difference between measured and theoretical value)

Table 2 Dilutional linearity of nivolumab in human plasma assessed by precision and accuracy (n = 4 experiments).

Dilution factor	Theoretical ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Measured ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% of the theoretical value	Precision (%CV)
1:2	150	145.9	97.3	7.2
1:4	150	148.4	98.9	11.4
1:8	150	169.6	113.1	4.1
1:16	150	157.3	104.9	8.3

Table 3: Baseline Characteristics and Demographics of Cohort

Baseline characteristics	N=27
Sex, n (%)	
Male	12 (46)
Female	15 (54)
Age (years)	68 [65-70]
Weight (kg)	70 [62-78]
ECOG performance status score, n (%)	
0	2 (7)
1	18 (67)
≥ 2	7 (26)
Smoking status, n (%)	
Current or former smoker	27 (100)
Non smoker	0 (0)
Non-small cell lung cancer characteristics, n (%)	
Adenocarcinoma	15 (56)
Squamous cell carcinoma	12 (44)
Biological values	
ALT (U/L)	25 [21-36]
AST (U/L)	27 [22-32]
Total bilirubin (μmol/L)	6 [5-7]
Creatinine (μmol/L)	78 [66-96]
Albumin (g/L)	41.0 [38.0-44.0]
Leukocytes (cells/μL)	6.6 [5.8-8.5]
Lymphocytes (cells/μL)	1.2 [1.0-1.5]
Hemoglobin (g/dL)	13.0[11.0-14.0]
IgM (U/L)	6 [5-7]
IgG (U/L)	10 [8-12]
IgA (U/L)	2 [2-3]
LDH (U/L)	225[193-245]

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; Ig, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenase;

Quantitative results are expressed as median [interquartile range].

Table 4 : Univariate and multivariate analysis of parameters potentially influencing trough nivolumab plasma concentration at day 42 after treatment start

Covariate	Univariate		Multivariate
	<i>rho</i>	P value	P value
Sex		0.86	
Age	-0.15	0.5	
Weight	0.07	0.73	
AST	0.16	0.29	
ALT	0.49	0.01	0.041
Bilirubin	0.35	0.08	0.7
Creatinine	-0.15	0.48	
Albumin	0.46	0.02	0.43
CRP	-0.31	0.14	
LDH	0.46	0.02	0.68
Leukocytes	0.0004	0.99	
Lymphocytes	-0.04	0.86	
Monocytes	-0.4	0.09	0.97
Hemoglobin	0.47	0.019	0.33
IgA	-0.35	0.09	0.53
IgM	0.053	0.8	
IgG	-0.6	0.002	0.002

ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase; CRP, C-reactive protein; Ig, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenase

2.2 Article 3 : Effets du nivolumab *in vivo* sur les kinases de CMSP

2.2.1 Introduction et objectifs

Comme nous l'avons abordé au cours de la première partie de ce manuscrit, les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 tels que le nivolumab font preuve de résultats prometteurs en termes de survie et de réponse chez les patients atteints de CBNPC. Il existe un certain nombre d'enjeux concernant l'utilisation de ces inhibiteurs des *checkpoints* immunitaires dans le but d'optimiser ces thérapies et d'en diminuer leur coût. C'est dans ce cadre que des biomarqueurs prédictifs de la réponse au nivolumab sont recherchés. L'expression tumorale du ligand PD-L1 a été suggérée comme biomarqueur afin d'enrichir les cohortes de patients répondeurs au nivolumab, dans le CBNPC notamment. Néanmoins, les résultats dans la littérature restent à ce jour discordants sur le caractère pronostic et prédictif de ce biomarqueur. Dans ce contexte, l'identification de biomarqueurs reste essentielle chez les patients atteints de CBNPC traités par nivolumab.

L'approche kinomique permettant d'étudier l'activité des kinases au sein des cellules est de plus en plus utilisée pour la recherche de biomarqueurs dans divers cancers. Certaines de ces études ont d'ailleurs été menées sur du tissu tumoral chez des patients CBNPC^{134,135,312}. A notre connaissance, aucune étude kinomique n'a été menée chez des patients atteints de CBNPC et traités par immunothérapie. Le PD-1 est largement exprimé à la surface des lymphocytes et est la cible pharmacologique du nivolumab. Par conséquent, l'étude des profils kinomiques des cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) chez des patients CBNPC traités par nivolumab permettrait d'évaluer les effets pharmacologiques de cette molécule sur les voies de signalisations lymphocytaires, d'élucider les mécanismes de résistance ainsi que d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Les objectifs de ce travail ont été d'une part, de comparer les profils d'activité des sérine/thréonine kinases (STK) des patients CBNPC (avant de débiter le nivolumab) à ceux de volontaires sains puis d'étudier les profils de patients CBNPC 14 jours après la première injection de nivolumab par approche kinomique.

2.2.2 Matériels et méthodes

Vingt-huit patients atteints de CBNPC ayant déjà reçu une première ligne de traitement ont été inclus et analysés prospectivement. Entre août 2015 et mai 2016, les patients inclus ont été traités à la dose recommandée de nivolumab (3 mg/kg toutes les 2 semaines). Un prélèvement sanguin a été réalisé pour chaque patient avant l'initiation du nivolumab (J0) et 14 jours après la première administration de nivolumab (J14).

Les prélèvements ont permis de quantifier le nivolumab plasmatique par la méthode ELISA que nous avons précédemment décrite³¹³ et d'isoler les CMSP en vue de l'étude kinomique. Les CMSP ont été isolées et lysées avant d'être stockées à -80°C, comme décrit précédemment³¹⁰. Pour chaque test 1 µg de protéines (quantifié par la technique de Bradford) ont été mélangé à une solution d'anticorps primaire anti-STK, d'ATP (400 µM) et de DMSO (diméthylsulfoxyde, 0,1%). Le mélange a été ensuite déposé sur un puits d'une STK PamChip®. Celle-ci comprend 4 puits identiques composés de 144 peptides substrats de STK fixés sur une membrane poreuse en oxyde d'aluminium. Le mélange est pompé à travers la membrane et après un rinçage une solution contenant un anticorps secondaire marqué au FITC (fluorescéine isothiocyanate) est déposé sur la puce. L'activité des STK a été mesurée et les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel BioNavigator®.

2.2.3 Résultats

2.2.3.1 Description de la cohorte

Vingt-huit patients CBNPC traités par nivolumab ont été inclus. La majorité des patients étaient des hommes (61 %) et l'âge médian de la cohorte était de 67 ans. L'adénocarcinome était le sous-type histologique le plus fréquemment observé (71 % des cas). La moitié des patients avaient reçu au moins 2 lignes de traitement avant le début du nivolumab, 14 % et 39 % des patients avaient été préalablement traités par ITK ou bevacizumab. Trois patients ont arrêté de manière définitive le nivolumab à la suite de toxicités sévères.

2.2.3.2 Analyse des profils kinomiques

La comparaison des profils kinomiques de base de CMSP de 12 volontaires sains et de 28 patients atteints de CBNPC à J0 a montré que la phosphorylation de 67 peptides était

significativement supérieure chez les patients ($p < 0,05$). Plusieurs kinases des familles CAMK et AGC, en particulier Akt, sont plus actives chez les patients. Une analyse des profils en composantes principales (PCA) a permis une bonne séparation des profils de patients CBNPC de ceux des volontaires sains. Il existe cependant une large variabilité interindividuelle des profils d'activité parmi les patients, puisque certains profils étaient très proches de ceux des volontaires. Néanmoins, grâce à une analyse par la méthode des moindres carrés (PLS-DA) il a été possible de prédire avec justesse dans 92 % et 96 % des cas l'origine du prélèvement (pour les volontaires sains et les, patients, respectivement) à partir du profil kinomique.

Deux groupes (A et B) ont pu être distingués au sein de la population de patient avant initiation du traitement par nivolumab. La comparaison des profils a montré que les profils du groupe A présentaient une phosphorylation des peptides inférieure à celle du groupe B pour 79 peptides ($p < 0,05$). En particulier les STK telles que ZC1/2/3/4, NEK, DAPK et CDK étaient moins activées dans le groupe A. Enfin, le nombre de lymphocytes T CD8 ($p = 0,023$) était statistiquement plus élevé dans le groupe A.

Deux groupes (C et D) ont pu être distingués à partir des profils d'inhibition observés à J14 après une perfusion unique de nivolumab. Le groupe C présente une plus forte activation des STK pour 66 peptides ($p < 0,05$). Parmi ces kinases impliquées, sont retrouvées : CAMK, Akt, NEK, AurA/C, PLK et PKC. Par ailleurs, les patients du groupe D avaient été plus fréquemment traités au préalable par bevacizumab (56 % *vs* 10 %, respectivement; $p = 0,041$) et présentaient à J14 environ 3 fois plus de LT CD8 que les patients du groupe C (339 *vs* 140 cellules/mm³, respectivement; $p = 0,05$).

2.2.3.3 *Facteurs pronostic de la survie sans progression*

La survie sans progression (SSP) médiane au sein de la cohorte était de 90 jours (intervalle de confiance à 95 %, IC95%, 47-135). L'analyse multivariée selon le modèle de Cox a montré que la CRP (C-reactive protein) (*Hazard Ratio* [HR], 1,21; Intervalle de confiance IC95% : 1,06-1,39; $p = 0,005$) et le nombre de neutrophiles (HR, 1,53; IC95%, 1,23-1,89; $p = 0,0001$) étaient indépendamment associés à la SSP.

2.2.4 Discussion

Cette étude est la première à montrer qu'il existe une différence entre les profils de base des CMSP de patients atteints de CBNPC et ceux de volontaires sains. De plus, la modélisation par PLS-DA a permis de classer les échantillons provenant de volontaires ou de patients avec justesse dans 92 % et 96 % des cas. L'activité des kinases est plus importante chez les patients, particulièrement celles de la voie de signalisation PI3K/Akt. La plupart des patients de notre cohorte ont été précédemment traités par un sel de platine, par etoposide ou par paclitaxel. Ces chimiothérapies sont capables d'induire la voie PI3K/Akt au sein de la tumeur³¹⁴, tout comme le cisplatine au sein de lignées de lymphocytes T (cellules Jurkat, de leucémie ou de lymphome)³¹⁵. La précédente ligne de traitement des patients pourrait expliquer en partie la plus forte activité d'Akt chez les patients CBNPC par rapport aux volontaires sains. Par ailleurs, une exposition prolongée aux antigènes entraîne une activation de la voie Akt/mTORC1 dans les LT CD8³¹⁶. Dans ce contexte, on ne peut pas exclure que l'exposition aux antigènes tumoraux puisse être impliquée dans l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR chez les patients atteints de CBNPC.

De manière intéressante, deux groupes (A et B) de profils chez les patients ont été identifiés avant l'initiation du traitement. L'activité de la plupart des STK était moins forte dans le groupe A, en particulier ZC4 (NRK=*NIK-related kinase*). ZC4 est impliquée dans l'activation de la voie JNK (*Jun amino terminal kinase*). JNK entraîne la différenciation et la mort cellulaire dans plusieurs types de cellules³¹⁷. JNK2 est nécessaire à la production de l'IFN γ par les lymphocytes T helper 1 (Th1)³¹⁸ alors que JNK1 régule de manière négative la différenciation des Th2. Ainsi la voie JNK régule différents aspects de la réponse immunitaire médiée par les LT et sont importants pour la différenciation des LT CD4 Th1. Les Th1 activent et régulent la réponse immunitaire à médiation cellulaire³¹⁹. Ceci pourrait expliquer que l'activité de ZC4 soit associée avec une modulation du nombre de LT.

Cette étude est également la première à notre connaissance à évaluer l'effet pharmacologique du nivolumab sur les STK de CMSP de patients atteints de CBNPC. L'analyse des profils d'inhibition à J14 a permis de mettre en évidence deux groupes (C et D). La plupart des kinases, en particulier celles de la voie PI3K/Akt, étaient plus activées dans le groupe C. Il est intéressant de constater que moins de patients dans le groupe C ont été pré-traités par du bevacizumab (10 % *vs* 55 % respectivement, $p=0,041$). Le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui se fixe spécifiquement au VEGF-A. Plusieurs études ont montré que le niveau d'expression du PD-1

était augmenté par le VEGF-A^{143,306}, suggérant que le taux d'expression de PD-1 serait supérieur à la surface des CMSP des patients du groupe C. De plus, l'augmentation de l'expression du PD-1 à la surface des LT CD4 entraîne une diminution d'activité de la voie PI3K/Akt/mTOR³²⁰. Étant donné que l'activité de la voie PI3K/Akt/mTOR est supérieure dans le groupe C, l'ensemble de ces résultats laissent à penser que le nivolumab aurait une activité pharmacologique supérieure chez les patients n'ayant pas reçu de bevacizumab précédemment.

Les patients du groupe D ont par ailleurs plus de LT CD8 circulants. Les lymphocytes T CD8 naïfs peuvent proliférer et générer des lymphocytes T CD8 mémoires, indépendamment d'une stimulation antigénique, en réponse aux cytokines IL-17 ou IL-15 ou secondairement à une lymphopénie. Cette prolifération des lymphocytes naïfs T CD8 indépendante d'une stimulation antigénique est nommée prolifération homéostatique et joue un rôle important dans le maintien du nombre de lymphocytes T CD8. Li *et al* ont montré que mTOR avait un rôle central dans la réponse T CD8 induite par la prolifération homéostatique et dans l'immunité antitumorale^{321,322}. Nos résultats confirment ces données puisque l'inhibition d'Akt et donc de mTOR était associée à une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8.

La médiane de la SSP est en accord avec les résultats des précédentes études de Phase III^{266,276}. L'analyse multivariée a mis en évidence que la CRP et le nombre de neutrophiles à J0 étaient des facteurs pronostic de la SSP. Les neutrophiles contribuent à l'expression de la cytokine IL-17 dans le stroma de plusieurs cancers dont le cancer bronchique³²³. Il a été rapporté que l'IL-17 favorisait la prolifération du CBNPC chez des souris C57BL/6³²⁴. L'expression tissulaire de l'IL-17 a été identifiée comme étant un facteur pronostic indépendant de la survie globale (SG) et de la SSP dans différents types tumoraux dont le CBNPC^{325,326}. Ces données pourraient donc en partie expliquer pourquoi le nombre de neutrophiles à J0 favoriserait une progression précoce chez les patients CBNPC traités par nivolumab.

Enfin la CRP est aussi un facteur prédisant une mauvaise SSP. L'inflammation liée au cancer peut avoir un impact sur de nombreux aspects comme la dissémination métastatique, l'angiogenèse ou l'échappement au système immunitaire. Le facteur de migration des macrophages (MIF) est une cytokine inflammatoire qui entraîne une augmentation du nombre de sous-populations de cellules dérivées cellules immunosuppressives dérivées de la moelle (MDSC) au sein de la tumeur, entraînant la croissance tumorale et la formation de métastases³²⁷. Plusieurs études ont rapporté que l'expression de MIF pouvait être impliquée dans l'échappement immunitaire dans des cancers

tels que le rhabdomyosarcome et le glioblastome^{328,329}. De plus, l'expression de MIF est très augmentée dans les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde³³⁰. Dans ce contexte, une plus forte expression de MIF en lien avec une plus forte inflammation pourrait contribuer à l'échappement tumorale au système immunitaire chez nos patients CBNPC et par conséquent à une plus courte SSP.

Pour conclure, ce travail a permis de montrer que la voie PI3K/Akt/mTOR est altérée dans les CMSP de patients CBNPC traités par nivolumab et ce avec une grande variabilité d'un patient à l'autre. Une étude plus approfondie de la voie PI3K/Akt/mTOR au sein des CMSP serait donc intéressante dans le but d'identifier des mécanismes de résistance et l'identification de biomarqueurs chez des patients traités par nivolumab.

Cette étude a fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission à Clinical Cancer Research, intitulée : « Kinomic profiling of peripheral blood mononuclear cells from non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab »

G. Noé, A. Bellesoeur, L. Golmard, A. Thomas-Schoemann, P. Boudou-Rouquette, A. Puszkiel, J. Arrondeau, J. Alexandre, F. Goldwasser, B. Blanchet, M. Vidal.

**KINOMIC PROFILING OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
FROM NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS TREATED WITH
NIVOLUMAB**

G. Noé^{1,2}, A. Bellesoeur^{2,3}, L. Golmard⁴, A.Thomas-Schoemann^{1,2,5}, P. Boudou-
Rouquette^{3,5}, A. Puzkiel¹, J. Arrondeau^{3,5}, J. Alexandre^{3,5,6}, F. Goldwasser^{3,5,6}, B.
Blanchet^{1,5*}, M. Vidal^{1,2,4,5}

¹ Department of Pharmacokinetics and Pharmacochemisty, Hôpital Cochin, AP-HP,
Paris, France;

²UMR8638 CNRS, Faculty of Pharmacy, University Paris Descartes, PRES Sorbonne
Paris Cité, Paris, France ;

³ Department of Medical Oncology, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; Université
Paris Descartes, CARPEM, Paris, France;

⁴ Biopathology Department, Institut Curie, Paris, France;

⁵Immunomodulatory Therapies Multidisciplinary Study group (CERTIM), Hôpital
Cochin, AP-HP, Paris, France;

⁶U1016 INSERM, UMR 8104 CNRS, UMR-S1016, CARPEM, Université Paris
Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

*Any correspondence and/or reprint requests should be addressed to:

Dr Benoit Blanchet,

Unité Fonctionnelle de Pharmacocinétique et de Pharmacochimie

Hôpital Cochin, APHP, 75014 Paris, France

Tel: + 33 1 58 41 23 13, Fax: + 33 1 58 41 23 15

Email: benoit.blanchet@aphp.fr

Key words: nivolumab, kinome, PBMC, non-small-cell lung cancer, immunotherapy

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide, with 1,825 million diagnoses and 1.59 million deaths in 2012 [1]. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85 to 90% of all lung cancers. In the last years, the use of comprehensive mutation analysis technologies has accelerated the identification of genetic aberrations in NSCLC and therefore the clinical development of new targeted therapies such as EGFR and ALK inhibitors [2]. Additionally, a better understanding of the antitumor immunity highlighted the key role of immune checkpoints such as cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and programmed death 1 (PD-1) in immune escape mechanisms [3]. The anti-PD-1 monoclonal antibody nivolumab binds to the PD-1 receptor and blocks its interaction with PD-L1 and PD-L2, thereby releasing PD-1 pathway-mediated inhibition of the immune response, including anti-tumor immune response [4]. Two Phase III trials showed that nivolumab improved overall survival, response rate, and progression-free survival compared to docetaxel in patients with advanced, previously treated squamous-cell and nonsquamous NSCLC [5], [6]. Nivolumab is currently approved for the treatment of patients with advanced-stage squamous and nonsquamous NSCLC following progression on or after platinum-based chemotherapy.

New challenges related to treatment optimization and economic reasons are emerging with the introduction of PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors such as nivolumab. The tumor expression of PD-L1 was initially suggested as biomarker for patient's selection. The Phase III trial conducted in nonsquamous NSCLC treated with nivolumab was in favor of a predictive value [6], while the Phase III trial in squamous NSCLC the

expression of the PD-L1 was neither prognostic nor predictive of benefit [5]. Recently, the Food and Drug Administration approved the tumor expression of PD-L1 as companion test for PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors. However, clinical activity and durable response can be observed in some NSCLC patients in whom tumor expression of PD-L1 is negative. Taken together, these results suggest that the sensitivity of PD-L1 assay is not perfect to discriminate nonresponders *versus* responders. In this context, the research of reliable predictive biomarkers is always ongoing in order to identify NSCLC patients who will benefit the most from treatment with nivolumab.

The use of kinomic approach based on global kinases activities is currently spreading to seek prognostic and therapy-predictive biomarkers in oncology [7]–[13]. Two studies applying kinomic approach have been conducted in NSCLC patients. Hilhorst et al. showed that a classifier based on basal kinase activity profiles in tumor tissue predicted erlotinib response in 14 NSCLC patients in a neoadjuvant setting [14]. The model was then validated from an external cohort of NSCLC patients (n= 13) [15]. Anderson et al. recently demonstrated the feasibility to use electromagnetic navigational bronchoscopy specimens for the research of future biomarkers in NSCLC patients [12]. To our best knowledge, no study has still investigated the kinomic profile of NSCLC patients treated with immunotherapy. Given PD-1 is largely expressed on lymphocytes and is the pharmacological target of nivolumab, it would be interesting to explore the kinomic profiles in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from NSCLC patients treated with nivolumab. This may provide helpful informations to identify the pharmacological

effect of nivolumab on signaling pathways in lymphocytes, to elucidate resistance mechanisms and to seek circulating biomarkers.

The aims of the present study were firstly to compare the global serine/threonine kinase kinase (STK) activity in PBMC from healthy volunteers and NSCLC patients before nivolumab treatment; then to characterize the kinomic profile in NSCLC patients after a single administration of nivolumab. A high throughput kinomic profiling method was employed for these purposes.

Methods

Population and Study design

From August 2015 to May 2016, a total of 28 consecutive outpatients treated with single-agent nivolumab for metastatic NSCLC were prospectively analyzed. The study was conducted in the oncology department of Cochin University Hospital in Paris, France. All patients met the following inclusion criteria were : age > 18 years, previously treated with chemotherapy and/or targeted therapy (tyrosine kinase inhibitors or bevacizumab) and Eastern Cooperative Oncology Group – Performance status (ECOG) ≤ 2 . Patients with autoimmune disease were excluded. Blood samples for every patient were collected before treatment initiation (D0) and just before the second nivolumab infusion (D14). Biochemical parameters (albumine, C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase) and hematological parameters including subset analyses of peripheral lymphocytes were determined at days 0 and 14. Additionally, the concentration of nivolumab in plasma was assayed at day 14. Patients were clinically evaluated every 2 weeks.

Ethics Statement

This study was approved by the local medical ethical board and all subjects provided written informed consent and agreed to the sampling and kinomic analysis in accordance with the Declaration of Helsinki.

Treatment schedule

All NSCLC patients were treated with the recommended daily dose of nivolumab (3mg/kg every two weeks). Nivolumab-related adverse events were graded according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) version 4.0. Nivolumab administration was continued until disease progression, intolerable adverse events or patient refusal. In case of grade ≥ 2 toxicity, the treatment was discontinued until adverse events returned to baseline, if needed corticosteroids could be used to help resolution. In case of grade 4 toxicity (or grade 3 pneumonitis, colitis and adrenal insufficiency), nivolumab was permanently discontinued.

Response assessment

Tumor response was assessed with the use of imaging after 2 months treatment, and then every 2 months. Disease control rate was defined as complete response (CR), partial response (PR) and stable disease (SD). Progression free survival (PFS) was defined as the time between the first infusion of nivolumab and disease progression or any-cause of death. In case of radiological progression, a second imaging after 4 weeks had to confirm the first one.

Nivolumab concentration assay in plasma

Plasma concentration of nivolumab was determined at day 14 (just prior the second infusion) using a home-made ELISA method, as previously described by our group [16]. The intra- and inter-assay coefficients of analytical variability were less than 5% and 12%, respectively. The lower limit of quantification was 3 $\mu\text{g/mL}$.

Sample collection and processing for kinomic profiling

Whole blood samples (10 mL) were collected in healthy volunteers (n=12) and patients (at D0 and D14). Then, PBMC were isolated and treated before storage at -80°C up to kinomic analysis, as previously described [9].

Protein quantification was performed using standard Bradford protein assay (Thermo Scientific). For each experiment 1 µg of protein lysate was added to the assay mixture, containing 400 µM ATP and primary STK antibody solution (PamGene International B.V., 's Hertogenbosch, The Netherlands). The mixture was loaded onto STK PamChip®. The latter contains 4 identical arrays where 144 tyrosine-containing peptides (13 amino acids long) derived from known human phosphorylation sites are immobilized on a porous membrane. The mixture was pumped up and down through the porous membrane. After a washing step, a mixture of secondary antibody FITC-labeled (fluorescein isothiocyanate) (PamGene) was used for visualization.

STK activity profiling was performed using a PamStation®12 (PamGene). Peptide phosphorylation was recorded after adding the secondary antibody by assessing fluorescence with a CCD camera in combination with Evolve software v. 1.2 (PamGene) at different exposure times (20, 50, 100 and 200 ms).

Kinomic profiles of healthy volunteers and NSCLC patients (days 0 and 14) were studied by spiking in vehicle (0.1% of dimethyl sulfoxide, DMSO) into the assay incubation mixture and performing the two-step STK kinomic assay.

Statistical analysis for kinomic approach

Image analysis and signal quantification were performed using the BioNavigator[®] software v. 6.1 (PamGene) interfaced with R (Bioconductor). All peptides with low signal were removed using the variation of biological replicates. Peptides presenting nominal CV (coefficient of variation) lower than 50% were preselected ("QC list") and Log₂-transformed ("Log₂Signal"). Log fold change (LFC) was obtained by making the difference between D14 Log₂Signal and D0 Log₂Signal. Unsupervised hierarchical analysis, using Euclidean distance metrics and complete linkage, of peptide signals (Log₂Signal or LFC) was performed and displayed as heatmaps. Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream STK from the peptides lists within the clusters. Student's T-tests were used to compare healthy and patients profiles. Unsupervised multivariate clustering of samples was evaluated with Principal Component Analysis (PCA). Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream STK. Supervised multivariate analysis of conditions was conducted by applying partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in Matlab Statistics Toolbox (MathWorks, Naticke, MA) implemented in the BioNavigator[®]. Prediction performance was evaluated by 20-fold cross-validation to ensure that the model was optimized completely independent of the test sample.

Statistical analysis

Descriptive statistics used numbers (percentages) for qualitative variables and median [inter-quartile intervals] for quantitative ones. Evolutions of biological parameters were analyzed using repeated measure ANOVA, followed by Tukey's tests for pairwise comparisons when the global test was significant. Comparisons between two clusters

were tested using Fisher's exact tests for qualitative variables and Mann-Whitney-Wilcoxon tests for quantitative ones. PFS was analyzed in the framework of survival analysis. Thus, the PFS function was estimated by the Kaplan-Meier method. The univariate analysis of the potential prognostic factors was based on univariate Cox models, and a multivariate analysis was performed using a stepwise Cox model regression. Variables with a univariate p-value lower than 0.10 were entered in the stepwise regression, and variables with a multivariate Wald p-value lower than 0.05 were retained in the final model. All computations were performed using the SAS v 9.4 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Patients

Twenty-eight NSCLC patients treated with nivolumab were included. Clinical and biological baseline characteristics of NSCLC patients are summarized in Table 1. The majority of the patients were male (61%) and the median age was 67 years old [63-70]. The most frequent histological tumor type was adenocarcinoma (71%). Half patients initially received at least 2 treatments lines before nivolumab initiation, including tyrosine kinase inhibitor (14%) or bevacizumab (39%). No significant variation in biochemical and hematological parameters was observed over time (data not shown). Three NSCLC patients (11%) definitively discontinued nivolumab therapy related to severe toxicities : grade 4 diarrhea (n=1); grade 3 dyspnea with hypercalcemia (n=1) and grade 3 dyspnea with pulmonary hypertension (n=1). At data cut-off, 6 NSCLC patients (21%) were still treated with nivolumab.

Basal kinomic activity profiles in PBMC from healthy volunteers and NSCLC patients

Basal STK activity in PBMC from 28 NSCLC patients and 12 healthy volunteers were assessed using kinomic approach. Median age was 50 [48-57] years in healthy volunteers (n=12), and half of them were male.

After applying nominal CV threshold, there were only 80 STK substrates left. Unsupervised PCA showed a good separation between healthy volunteers and NSCLC patients. In contrast with healthy volunteers, a large interindividual variability in kinomic activity profiles was observed in NSCLC patients (Figure 1A). Additionally,

some NSCLC patients present basal STK activity profiles close to those of healthy volunteers. The supervised analysis using PLS-DA, evaluated by 20-fold cross-validation, classified healthy volunteers and NSCLC patients based on the basal STK kinomic profiles. Samples from NSCLC patients and healthy volunteers were correctly classified in 96% and 92% of cases, respectively (Figure 1B).

Furthermore, a Student's T-test was applied to compare healthy volunteers' STK kinomic profiles to those of patients. Majority of peptides were significantly different between these 2 groups (67 peptides with $p < 0.05$; 62 with $p < 0.01$), with a significant lower phosphorylation level for 75% of peptides in the healthy volunteers. Kinexus Kinase Predictor was used to determine putative upstream STK. The top 15 STK which were different between the 2 groups belong to CAMK family (VACAMKL, DCAMKL, CaMK2) and AGC family (Akt 1/2/3, PKC ϵ , PKA γ) (supplemental Figure 1).

Basal kinomic activity profiles in NSCLC patients

Basal STK kinomic profiles in PBMC from NSCLC patients could be divided in two major clusters (clusters A and B) after applying a hierarchical clustering (Figure 2). All patients in the cluster A et 2 patients in the cluster B presented baseline kinomic profiles close to those of healthy volunteers. In order to explain the difference in kinomic profiles between clusters A et B, different baseline parameters (demographical, clinical and biological) were compared (Table 2). Interestingly, the count of CD8+ cells ($p=0.023$) and the total body weight ($p=0.038$) were statistically different between the two clusters. Even if the PFS was twice longer in cluster A than in cluster B, it was not statistically different (103 vs 50 days, $p=0.29$).

Kinomic profiles of patients from clusters A cluster B were compared using a Students' T-test. Almost all peptides (79 with $p < 0.05$) showed significant lower phosphorylation in cluster A. Amongst the putative STK analysis we found less activity in ZC1/2/3/4, NEK4, CDK, DAPK kinases in PBMC from patients of cluster A.

Inhibition profiles in patients at D14

To evaluate the pharmacological effect of nivolumab on PBMC, the ratio of peptides phosphorylation at D14 and D0 ($LFC = \text{Log}_2\text{Signal at D15} - \text{Log}_2\text{Signal at D0}$) were investigated in the 28 NSCLC patients after a single administration of nivolumab. A large interindividual variability in kinomic profiles was observed (Figure 3). An unsupervised hierarchical clustering identified 2 major clusters (cluster C and cluster D), with 2 subsets within the cluster D (Figure 3). Cluster C presents activation profiles whereas a part of cluster D is composed by strong inhibition profiles. The comparison of clusters C and D showed a statistical difference for 66 peptides ($p < 0.05$). CAMK, Akt, NEK, AurA/C, PLK, PKC kinases were found to be involved in the difference observed between group C and group D profiles.

Table 3 presents the demographical clinical and biological (day 14) characteristics of clusters C and D. Interestingly, a prior treatment with bevacizumab was statistically more frequent in the cluster D (10% vs 56%, in group C and D respectively; $p = 0.041$). Additionally, patients in cluster D had significantly more (2.5-fold) lymphocytes T CD8+ (339 vs 140 cells/mm³, respectively; $p = 0.05$). As before, PFS was 2 times higher in cluster A at D15 but was not significant (103 vs 57 days, $p = 0.55$).

Prognostic factors of PFS

The median PFS in the cohort was 90 days (confidence interval, CI95%, 47-135). In univariate analysis (Table 4), the number of nivolumab cycles, baseline natural killers and neutrophils count, baseline CRP level were associated with PFS ($p < 0.05$). Multivariate Cox proportional hazards model analysis showed that CRP (hazard Ratio [HR], 1.21; CI95%, 1.06-1.39; $p = 0.005$) and neutrophils count (HR, 1.53; CI95%, 1.23-1.89; $p = 0.0001$) were independently associated with PFS.

Discussion

The present study is the first to show that basal kinomic profiles of PBMC from NSCLC patients would be different from healthy volunteers. Additionally, we could classify samples from healthy volunteers and NSCLC in 92% and 96% of cases, respectively. The activity of most STK was higher in NSCLC patients, especially those of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway. Most of NSCLC patients previously received chemotherapy agents such as platinum compounds, etoposide or paclitaxel. These chemotherapy agents are known to induce the PI3K/Akt pathway in tumor [17]. Additionally, Yan *et al.* recently showed that exposure of T-leukemia/lymphoma cells or Jurkat T cells to cisplatin upregulated miR181a expression and resulted in Akt activation [18]. In this context, one hypothesis could be that the previous chemotherapy treatment would contribute to the increased Akt activation in NSCLC patients compared to healthy volunteers. Besides, the PI3K/Akt pathway is known to play a central role in T-cell proliferation, function, and survival [19]. Additionally, its activation is tightly controlled by signals through the T cell receptor (TCR) and the co-stimulatory receptor CD28 [20]. Interestingly, Li *et al.* showed that persistent Ag exposure results in the activation of Akt/mTORC1 pathway in Ag-specific CD8 T cells [21]. In this context, one cannot exclude that continuous Ag exposure linked to cancer could also contribute to this sustained activation of PI3K/Akt signaling pathway in NSCLC patients.

Interestingly, we could identify two distinct clusters (A and B) in basal kinomic profiles of PBMC from NSCLC patients. The activity of most STK was lower in cluster A, especially that of ZC4 (NRK=NIK-related kinase). ZC4 is a kinase involved in c-Jun

amino terminal kinases (JNK) pathway activation. JNK have been involved in differentiation and cell death in different cell types [22]. JNK2 is required for IFN- γ production by Th1 cells [23] whereas JNK1 negatively regulates Th2 differentiation. Therefore, JNK signaling pathways regulate different aspects of T-cell mediated immune responses, and are important for CD4⁺ Th1 cell differentiation. Th1 cells are primarily responsible for activating and regulating T cells mediated immune response. This could explain the association between ZC4 activity and T cells number [24]. Finally, the total body weight was also statistically different between the two groups. However, we do not have any hypothesis to explain a potential influence of total body weight on basal STK kinomic profile in PBMC.

To our best knowledge, the present study is also the first to characterize the pharmacological effect of nivolumab on STK kinomic profile in PBMC from NSCLC patients. At day 14, two distinct clusters (C et D) could be identified. The activity of most STK was higher in the cluster C, especially those of the PI3K/Akt signaling pathway. The plasma trough concentration of nivolumab at day 14 was similar in two clusters, suggesting that plasma drug exposure could not explain the interindividual variability in kinomic profiles after a single administration of nivolumab. In the same way, basal kinomic profil of NSCLC patients cannot contribute to this variability in the pharmacological effect of nivolumab since the proportion of patients from cluster A was similar in two clusters C and D. Interestingly, less patients in the cluster C were previously treated with bevacizumab (10% vs 55%, respectively, $p=0.041$). Bevacizumab is a monoclonal antibody which specifically binds to the VEGF-A in the systemic circulation. Different studies showed that the expression level of PD-1 on

lymphocytes is enhanced by VEGF-A [25], [26], which suggests that the expression level of PD-1 could be higher on PBMC from patients of cluster C. Celada *et al.* recently reported that PD-1 upregulation in CD4+ T cells decreases the expression of key mediators of cell cycle progression, including the PI3K/Akt/mTOR pathway [27]. Finally, in the present study, the activity of STK involved in the PI3K/Akt signaling pathway was higher in the cluster C. Taken together; these results suggest that nivolumab could have a greater pharmacological effect on PI3K/Akt/mTOR pathway in lymphocytes from NSCLC not previously treated with bevacizumab. Interestingly, the number of CD8+ cells was statistically higher in cluster D than in cluster C. The antigen-independent proliferation of naïve CD8 T cells is defined as homeostatic proliferation, and it plays an important role in maintaining normal CD8 T cells numbers. Li *et al.* have shown that mTOR had a central role in the homeostatic proliferation induced CD8 T cells response and anti-tumor immunity [28]. Their study suggests that mTOR inhibition and the enrichment of the CD8 population may work together to regulate T cell homeostasis. This is in accordance with our results, since the lower Akt (and consequently mTOR) activity in cluster D was combined with an increased number of CD8 T cells.

In the present study, the median PFS in our cohort was in accordance with those reported in 2 Phase III trials [5], [6]. In Multivariate Cox proportional hazards model analysis identified baseline neutrophils count and CRP as an independent prognostic factor of PFS. Punt *et al.* recently documented that neutrophils contribute to 68% of IL-17 expression in stroma of cervical cancer [29]. The same pattern of expression was documented for other tumors including lung cancer. Wei *et al.* recently documented that

IL-17 can foster the NSCLC growth in C57BL/6 mice [30]. Additionally, IL-17+ cells were found to be an independent predictor for poor survival in early stage disease (HR ratio of 5.2) in squamous cervical cancer, and neutrophils showed a trend toward association with poor survival. A recent systematic review showed that IL-17 expression in tissues has been identified as independent prognostic factor in both overall and disease-free survival in different tumor types [31], including NSCLC patients [32]. Taken together, these results could explain in part why an increased baseline neutrophils count could foster an early progression disease in NSCLC patients treated with nivolumab. Finally, baseline CRP (HR 1.21) was also found to be an independent predictor for poor PFS. Cancer-related inflammation can affect many aspects of malignancy including in other tumor metastasis, angiogenesis tumor response and immune escape. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is an inflammatory cytokine whose expression increases the prevalence of a highly immunosuppressive subpopulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) within the tumor, resulting in tumor growth and metastasis [33]. Different studies have reported that expression of MIF may be involved in immune evasion in tumor types such as rhabdomyosarcoma and glioblastoma [34], [35]. Additionally, the expression of MIF is known to be strongly increased in inflammatory disease such as rheumatoid arthritis [36]. In this context, one hypothesis would be that a higher expression of MIF related to an increased inflammatory status could contribute to the immune escape in the patients and the poor PFS in NSCLC patients.

In conclusion, this work shows that the PI3K/Akt/mTOR pathway is altered in PBMC from NSCLC patients treated with nivolumab, and that its level of alteration is very

variable between patients. This study paves the way for further investigations about PI3K/Akt/mTOR pathway in PBMC to both identify resistance mechanisms and future biomarkers in NSCLC patients treated with nivolumab.

Conflicts of interest

The PamStation® 12 was kindly lent by PamGene international.

The remaining authors have declared that no conflicts of interests exist.

Grant support

This work was supported by Fondation Martine Midy (BQ1015 to GN)

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.," *Int. J. cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-86, Mar. 2015.
- [2] F. R. Hirsch, K. Suda, J. Wiens, and P. A. Bunn, "New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer.," *Lancet (London, England)*, vol. 388, no. 10048, pp. 1012-24, Sep. 2016.
- [3] N. A. Pennell, "Understanding the Rationale for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer.," *Semin. Oncol.*, vol. 42 Suppl 2, pp. S3-10, Oct. 2015.
- [4] D. M. Pardoll, "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 252-264, Apr. 2012.
- [5] J. Brahmer, K. L. Reckamp, P. Baas, L. Crinò, W. E. E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E. E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Arén Frontera, L. Havel, M. Steins, M. C. Garassino, J. G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudelet, C. T. Harbison, B. Lestini, and D. R. Spigel, "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 2, pp. 123-35, Jul. 2015.
- [6] H. Borghaei, L. Paz-Ares, L. Horn, D. R. Spigel, M. Steins, N. E. Ready, L. Q. Chow, E. E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhäufel, O. Arrieta, M. A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D. E. Gerber, S. N. Gettinger, C. M. Rudin, N. Rizvi, L. Crinò, G. R. Blumenschein, S. J. Antonia, C. Dorange, C. T. Harbison, F. Graf Finckenstein, and J. R. Brahmer, "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 17, pp. 1627-39, Oct. 2015.
- [7] M. G. Saelen, K. Flatmark, S. Folkvord, R. De Wijn, H. Rasmussen, Fodstad, A. H. Ree, Ø. Fodstad, and A. H. Ree, "Tumor kinase activity in locally advanced rectal cancer: Angiogenic signaling and early systemic dissemination," *Angiogenesis*, vol. 14, no. 4, pp. 481-489, Dec. 2011.
- [8] S. Folkvord, K. Flatmark, S. Dueland, R. De Wijn, K. K. Grøholt, K. H. Hole, J. M. Nesland, R.

- Ruijtenbeek, P. J. Boender, M. Johansen, K.-E. E. Giercksky, A. H. Ree, K. K. Groholt, K. H. Hole, J. M. Nesland, R. Ruijtenbeek, P. J. Boender, M. Johansen, K.-E. E. Giercksky, A. Hansen Ree, K. K. Grøholt, K. H. Hole, J. M. Nesland, R. Ruijtenbeek, P. J. Boender, M. Johansen, K.-E. E. Giercksky, and A. H. Ree, "Biology contribution prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by multiplex kinase activity profiling," *Int J Radiat. Oncol. Biol Phys*, vol. 78, no. 2, pp. 555–562, Oct. 2010.
- [9] G. Noé, A. Bellesoeur, A. Thomas-schoemann, F. Naji, A. Puszkiel, O. Huillard, N. Saidu, J. Alexandre, F. Goldwasser, B. Blanchet, and M. Vidal, "Clinical and kinomic analysis identifies peripheral blood mononuclear cells as a potential pharmacodynamic biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib," 2016.
- [10] J. C. Anderson, C. D. Willey, A. Mehta, K. Welaya, D. Chen, C. W. Duarte, P. Ghatalia, W. Arafat, A. Madan, S. Sudarshan, G. Naik, W. E. Grizzle, T. K. Choueiri, and G. Sonpavde, "High Throughput Kinomic Profiling of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma Identifies Kinase Activity Dependent Molecular Subtypes," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0139267, 2015.
- [11] J. C. Anderson, R. B. Taylor, J. B. Fiveash, R. de Wijn, G. Y. Gillespie, and C. D. Willey, "Kinomic alterations in atypical meningioma," *Med. Res. Arch.*, vol. 2015, no. 3, Jul. 2015.
- [12] J. C. Anderson, D. J. Minnich, M. C. Dobelbower, A. J. Denton, A. M. Dussaq, A. N. Gilbert, T. D. Rohrbach, W. Arafat, K. Welaya, J. A. Bonner, and C. D. Willey, "Kinomic profiling of electromagnetic navigational bronchoscopy specimens: a new approach for personalized medicine.," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e116388, 2014.
- [13] A. Tahiri, K. Røe, A. H. Ree, R. de Wijn, K. Risberg, C. Busch, P. E. Lønning, V. Kristensen, J. Geisler, K. Røe, A. H. Ree, R. De Wijn, K. Risberg, and C. Busch, "Differential Inhibition of Ex-Vivo Tumor Kinase Activity by Vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF Wild-Type Metastatic Malignant Melanoma," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 1–12, 2013.
- [14] H. R. S. E., van P. R., N. P., H. L., M. M., de W. R., van den H. M., B. P., R. R., K. H.M., and H. R. S. E.E., van P. R., N. P., H. L., de W. R., P. M. Nederlof, L. Houkes, M. Mommersteeg, R. de Wijn, M. van den Heuvel, P. Baas, R. Ruijtenbeek, "Blind prediction of response to erlotinib in early stage non-small cell lung cancer (NSCLC) in a neoadjuvant setting based on kinase activity profiles," *J Clin Oncol*, vol. 29, no. suppl, p. abstract 10521, 2010.
- [15] H. R. S. E.E., van P. R., N. P., H. L., de W. R., R. Ruijtenbeek, van den H. M., B. P., and K. H.M., "Application of kinase activity profiles to predict response to erlotinib in a neoadjuvant setting in early stage non-small cell lung cancer (NSCLC)," *J Clin Oncol*, vol. 28, no. 7s, p. abstract 10566, 2011.
- [16] A. Puszkiel, G. Noé, P. Boudou-Rouquette, C. Le Cossec, J. Arrondeau, S. Giraud, J. Alexandre, M. Vidal, F. Goldwasser, and B. Blanchet, "Evaluation of the interindividual variability in plasma nivolumab level in non-small-lung cancer outpatients: preliminary results," *Ann. Oncol.* 27 (Supplement 6) vi526-vi544, 2016. *Abstr. 1531P*.
- [17] W.-C. Huang and M.-C. Hung, "Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance.," *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 108, no. 3, pp. 180–94, Mar. 2009.
- [18] Z.-X. Yan, Z. Zheng, W. Xue, M.-Z. Zhao, X.-C. Fei, L.-L. Wu, L.-M. Huang, C. Leboeuf, A. Janin, L. Wang, and W.-L. Zhao, "MicroRNA181a Is Overexpressed in T-Cell Leukemia/Lymphoma and Related to Chemoresistance.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 197241, 2015.
- [19] T. So and M. Croft, "Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules.," *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 139, 2013.
- [20] K. Okkenhaug and B. Vanhaesebroeck, "PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 4, pp. 317–30, Apr. 2003.
- [21] Y. Li, C. Shen, B. Zhu, F. Shi, H. N. Eisen, and J. Chen, "Persistent Antigen and Prolonged AKT-mTORC1 Activation Underlie Memory CD8 T Cell Impairment in the Absence of CD4 T Cells.," *J. Immunol.*, vol. 195, no. 4, pp. 1591–8, Aug. 2015.
- [22] M. Rincón and G. Pedraza-Alva, "JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells.," *Immunol. Rev.*, vol. 192, pp. 131–42, Apr. 2003.
- [23] D. D. Yang, D. Conze, A. J. Whitmarsh, T. Barrett, R. J. Davis, M. Rincón, and R. A. Flavell, "Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2.," *Immunity*, vol. 9, no. 4, pp. 575–85, Oct. 1998.
- [24] K. L. Knutson and M. L. Disis, "Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy.," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 54, no. 8, pp. 721–8, Aug. 2005.

- [25] N. C. Twine, J. A. Stover, B. Marshall, G. Dukart, M. Hidalgo, W. M. Stadler, T. Logan, J. Dutcher, G. Hudes, A. J. Dorner, D. K. Slonim, W. L. Trepicchio, and M. E. Burczynski, "Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 18, pp. 6069–6075, 2003.
- [26] E. Noessner, D. Brech, A. N. Mendler, I. Masouris, R. Schlenker, and P. U. Prinz, "Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma.," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 8, pp. 1451–1453, 2012.
- [27] L. J. Celada, J. E. Rotsinger, A. Young, G. Shaginurova, D. Shelton, C. Hawkins, and W. P. Drake, "Programmed Death-1 Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signaling Impairs Sarcoidosis CD4+ T Cell Proliferation.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Aug. 2016.
- [28] Q. Li, R. R. Rao, K. Araki, K. Pollizzi, K. Odunsi, J. D. Powell, and P. A. Shrikant, "A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity.," *Immunity*, vol. 34, no. 4, pp. 541–53, Apr. 2011.
- [29] S. Punt, G. J. Fleuren, E. Kritikou, E. Lubberts, J. B. Trimbos, E. S. Jordanova, and A. Gorter, "Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer.," *Oncoimmunology*, vol. 4, no. 1, p. e984539, Jan. 2015.
- [30] L. Wei, H. Wang, F. Yang, Q. Ding, and J. Zhao, "Interleukin-17 potently increases non-small cell lung cancer growth.," *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, no. 2, pp. 1673–80, Feb. 2016.
- [31] S. Punt, J. M. Langenhoff, H. Putter, G. J. Fleuren, A. Gorter, and E. S. Jordanova, "The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review.," *Oncoimmunology*, vol. 4, no. 2, p. e984547, Feb. 2015.
- [32] X. Chen, J. Wan, J. Liu, W. Xie, X. Diao, J. Xu, B. Zhu, and Z. Chen, "Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients.," *Lung Cancer*, vol. 69, no. 3, pp. 348–54, Sep. 2010.
- [33] K. D. Simpson, D. J. Templeton, and J. V Cross, "Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 12, pp. 5533–40, Dec. 2012.
- [34] S. M. Johler, J. Fuchs, G. Seitz, and S. Armeanu-Ebinger, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by cytotoxic drugs and is involved in immune escape and migration in childhood rhabdomyosarcoma.," *Cancer Immunol. Immunother.*, Sep. 2016.
- [35] B. Otvos, D. J. Silver, E. E. Mulkearns-Hubert, A. G. Alvarado, S. M. Turaga, M. D. Sorensen, P. Rayman, W. A. Flavahan, J. S. Hale, K. Stoltz, M. Sinyuk, Q. Wu, A. Jarrar, S.-H. Kim, P. L. Fox, I. Nakano, J. N. Rich, R. M. Ransohoff, J. Finke, B. W. Kristensen, M. A. Vogelbaum, and J. D. Lathia, "Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion.," *Stem Cells*, vol. 34, no. 8, pp. 2026–39, Aug. 2016.
- [36] L. M. Brennan-Bourdon, U. De la Cruz-Mosso, Z. Reyes-Castillo, G. E. Martínez-Bonilla, M. G. Ramírez-Dueñas, M. C. Islas-Carbajal, A. R. Rincón-Sánchez, M. Salazar-Páramo, and J. F. Muñoz-Valle, "MIF and TNF α serum levels in rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs: a cross-sectional study.," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 37, no. 2, pp. 207–13, Apr. 2015.

Figure legends

Figure 1. Prediction of PBMC source from basal STK activity profiles.

A. The 3D plot, obtained after applying unsupervised Principal Component Analysis (PCA), separates samples in two groups. Each label represents a PBMC sample from 12 healthy volunteers (green) or 28 NSCLC patients (red). All volunteers, except one, remains in the same group.

B. Partial least squares discriminant analysis classifies healthy volunteers (blue) and patients (red) PBMC. Samples prediction scores were obtained based on a leave-one-out cross-validation. Samples with a positive score corresponds to predicted healthy volunteers whereas samples with a negative score corresponds to predicted NSCLC patients.

Figure 2. Unsupervised hierarchical clustering of basal kinase activity profiles among non-small-cell lung cancer patients PBMC.

The heatmap represents phosphorylation level ($\text{Log}_2\text{Signal}$) for 80 peptides of the “QC List” (Y-axis) sorted by hierarchical clustering. Two distinct clusters can be observed among the 28 patients PBMC.

Figure 3. Inhibition profiles in PBMC from non-small-cell lung cancer patients under nivolumab therapy.

Unsupervised hierarchical clustering, using LFC values ($\text{Log}_2\text{Signal}$ (nivolumab) - $\text{Log}_2\text{Signal}$ (DMSO)) of 80 STK substrates (Y-axis), separates NSCLC samples (n=28) in 2 major clusters. Red color represents a low inhibition level, whereas blue corresponds to a strong inhibition.

Figure 1. Prediction of PBMC source from basal STK activity profiles.

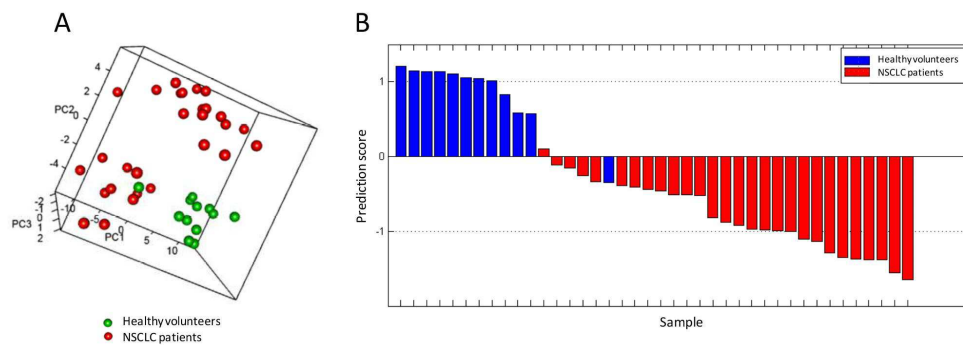


Figure 2. Unsupervised hierarchical clustering of basal kinase activity profiles among non-small-cell lung cancer patients PBMC.

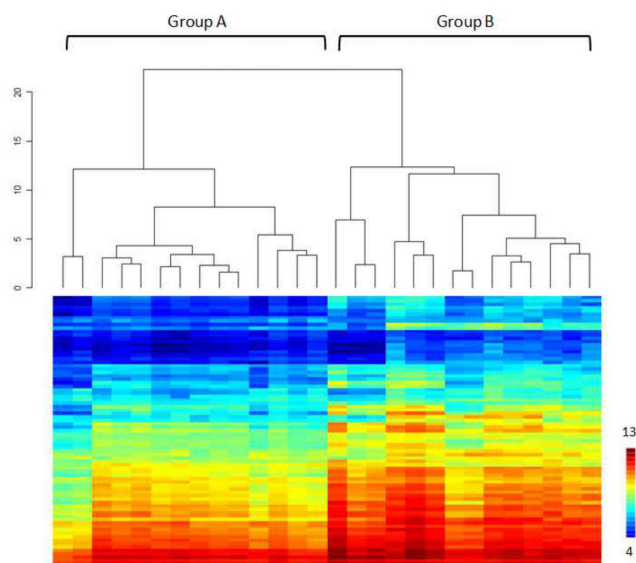


Figure 3. Inhibition profiles in PBMC from non-small-cell lung cancer patients under nivolumab therapy

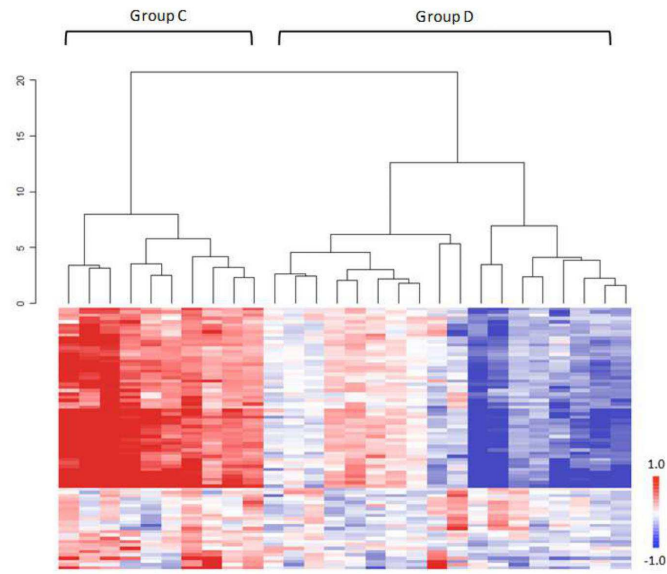


Table 1: Demographic and baseline characteristics of patients

Characteristics	n= 28
Demographic data	
Sex, n (%)	
Male	17 (61)
Female	11 (39)
Age (years)	67 [63-69]
Age > 70 years-old, n (%)	6 (21)
BMI (kg/m ²)	22.9 [19.9-24.1]
Lean Body mass (kg)	49.4 [42.2-56.4]
Smoking status, n(%)	
Current smoker	6 (21)
Former smoker	17 (61)
Never smoker	3 (11)
Non available	2 (7)
ECOG performance status, n (%)	
0-1	14 (50)
2-3	14 (50)
Non small cell lung cancer characteristics, n (%)	
Histological tumor type	
Squamous cell carcinoma	8 (29)
Adenocarcinoma	20 (71)
Metastasis	
Synchronous	19 (68)
Metachronous	9 (32)
Initial surgery	
Yes	10 (36)
No	18 (64)
Number of previous treatment line	
1	14 (50)
2	8 (29)
>2	6 (21)
Previous Targeted Therapy	
Tyrosine Kinase Inhibitor	4 (14)
Monoclonal antibody (bevacizumab)	11 (39)
None	14 (50)
Number of metastatic sites	
1	4 (14)
2	15 (54)
≥ 3	9 (32)
Cerebral metastasis	
Yes	9 (32)
No	19 (68)
Baseline Biological data	
Haemoglobin (g/dL)	12.9 [11.6-14.3]
Platelets (x10 ⁹ /L)	231 [204-298]
Lymphocytes (x10 ⁹ /L)	1.26 [0.98-1.65]
Neutrophils (x10 ⁹ /L)	5.38 [4.28-6.32]
Lymphopenia (<1 x10 ⁹ /L) before Nivolumab, n (%)	8 (29)
LDH	
Increased above ULN	12 (43)
Normal	10 (36)
Non available	6 (21)

BMI, body mass index; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; ULN Upper Limit of Normal. Results are expressed as median [interquartile range] or frequency (percent).

Table 2. Characteristics of the two clusters A and B of Non-Small-Cell Lung Cancer patients identified before treatment start (baseline)

	Cluster A (n=14)	Cluster B (n=14)	p value
Sex (female) (%)	50.0	71.4	0.44
Age (years old)	66 [63-74]	68 [62-69]	1.0
Total body weight (kg)	65 [53-68]	71 [62-74]	0.038
ECOG performance status, n (%)			0.26
0-1	9 (64)	5 (36)	
>1	5 (36)	9 (64)	
Current/former Smoker (%)	77.0	100.0	0.22
Histological tumor type, n (%)			1.0
Adenocarcinoma	10 (71.4)	10 (71.4)	
Squamous cell carcinoma	4 (28.6)	4 (28.6)	
Presence of mutation (%)	36.4	27.3	1.0
Time to metastasis (days)	0 [0-243]	0 [0-273]	0.74
Number of metastatic sites, n (%)			1.0
1-2	10 (71.4)	9 (64.3)	
>2	4 (28.6)	5 (35.7)	
Number of previous treatment line, n (%)			0.71
1-2	6 (42.9)	8 (57.1)	
>2	8 (57.1)	6 (42.9)	
Previous targeted therapy			
Tyrosine kinase inhibitors (%)	21.4	7.4	0.59
Bevacizumab (%)	36.0	43.0	1.0
Corticosteroids treatment (%)	14.3	21.4	1.0
Baseline biological characteristics			
C reactive protein (mg/L)	10.4 [1.3-15.4]	5.4 [3.2-31.9]	0.73
LDH (UI)	218 [193-267]	210 [197-303]	0.84
Albumin (g/L)	42 [40-45]	38 [36-42]	0.07
Neutrophils count (cells/mm³)	5180 [3820-6310]	5850 [5160-6350]	0.57

Lymphocytes count (cells/mm³)	1510 [1050-2020]	1140 [610-1460]	0.09
Neutrophils-lymphocytes ratio (NLR)	4.1 [2.3-5.4]	5.1 [3.6-7.0]	0.23
CD3+ cells count (cells/mm³)	1069 [750-1402]	822 [447-959]	0.14
CD4+ cells count (cells/mm³)	701 [301-914]	460 [235-640]	0.17
CD8+ cells count (cells/mm³)	365 [218-439]	137 [95-327]	0.023
B cells count (cells/mm³)	114 [88-204]	92 [34-170]	0.13
NK count (cells/mm³)	129 [82-145]	101 [64-153]	0.47
Proportion of CD3+ cells (%)	77.9 [70.9-85.6]	84.2 [76.7-90.8]	0.22
Proportion of CD4+ cells (%)	43.5 [36.6-54.7]	61.9 [35.2-69.2]	0.21
Proportion of CD8+ cells (%)	27.8 [17.9-35.5]	18.0 [10.4-36.7]	0.18
Proportion of NK cells (%)	9.2 [5.0-14.0]	9.6 [6.1-15.7]	0.66
Proportion of B cells (%)	11.2 [6.6-21.9]	10.6 [7.7-13.0]	0.56
Nivolumab treatment			
Number of nivolumab cycles	6 [3-10]	4 [3-4]	0.11
Clinical response (PR +SD) (%)	57.1	42.9	0.71
Tumor control at month 2 (PR + SD) (%)	41.7	25.0	0.68
Progression-free survival (days)	92 [38-158]	74 [44-135]	0.50

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; NK, natural Killer; PR, partial response ; SD, stable disease
Results are expressed as median [interquartile range] or frequency (percent).

Table 3. Characteristics of the two clusters C and D of Non-Small-Cell Lung Cancer patients identified after a single administration of nivolumab (14 days after treatment start)

	Cluster C (n=10)	Cluster D (n=18)	p value
Sex (female) (%)	70.0	55.5	0.69
Age (years old)	68 [64-70]	65 [62-69]	0.43
Total body weight (kg)	68 [61-71]	68 [54-73]	0.90
ECOG performance status, n (%)			0.24
0-1	3 (30)	11 (61.1)	
>1	7 (70)	7 (38.9)	
Current/former Smoker (%)	88.9	88.2	1.0
Histological tumor type, n (%)			0.40
Adenocarcinoma	6 (60.0)	14 (77.8)	
Squamous cell carcinoma	4 (40.0)	4 (22.2)	
Presence of mutation (%)	33.3	31.3	1.0
Time to metastasis (days)	0 [0-92]	0 [0-273]	0.82
Number of metastatic sites, n (%)			0.42
1-2	8 (80)	11 (61.1)	
>2	2 (20)	7 (38.9)	
Number of previous treatment line, n (%)			1.0
1-2	5 (50)	9 (50)	
>2	5 (50)	9 (50)	
Previous targeted therapy			
Tyrosine kinase inhibitors (%)	20.0	11.1	0.60
Bevacizumab (%)	10.0	55.6	0.041
Corticosteroids treatment (%)	0	27.8	0.13
Biological characteristics at day 15			
C reactive protein (mg/L)	6.5 [1.6-19.9]	11.9 [5.3-28.3]	0.40
LDH (UI)	265 [198-305]	198 [168-244]	0.28
Albumin (g/L)	39 [36-41]	36 [34-40]	0.25
Neutrophils count (cells/mm³)	5160 [4580-5870]	4960 [4560-5980]	0.92

Lymphocytes count (cells/mm³)	990 [860-1230]	1330 [790-1650]	0.41
Neutrophils-lymphocytes ratio (NLR)	4.25 [3.60-7.80]	4.20 [3.20-6.20]	0.71
CD3+ cells count (cells/mm³)	702 [637-846]	894 [503-1222]	0.29
CD4+ cells count (cells/mm³)	541 [394-618]	609 [207-806]	0.76
CD8+ cells count (cells/mm³)	140 [102-288]	339 [195-453]	0.05
B cells count (cells/mm³)	92 [59-122]	90 [59-184]	1.0
NK count (cells/mm³)	113 [100-160]	106 [68-177]	0.66
Proportion of CD3+ cells (%)	81.3 [75.2-94.4]	80.1 [60.6-88.7]	0.76
Proportion of CD4+ cells (%)	52.8 [43.4-59.4]	43.0 [31.9-56.4]	0.18
Proportion of CD8+ cells (%)	17.0 [14.6-27.0]	29.4 [17.9-42.1]	0.11
Proportion of NK cells (%)	11.1 [8.5-15.5]	9.8 [5.5-16.2]	0.50
Proportion of B cells (%)	10.2 [5.9-11.7]	8.3 [5.9-14.6]	0.54
Nivolumab treatment			
Number of nivolumab cycles	7 [3-8]	4 (3-6)	0.41
Plasma concentration (mg/L) at day 15	15.8 [13.0-22.9]	15.9 (12.4-18.8)	0.58
Clinical response (PR+SD) (%)	70.0	38.8	0.24
Tumor control at month 2 (PR+SD) (%)	28.6	35.3	1.0
Progression-free survival (days)	103 [19-161]	57 [45-135]	0.55

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; NK, natural Killer; PR, partial response ; SD, stable disease

Results are expressed as median [interquartile range] or frequency (percent).

Table 4. Cox proportional hazards model analysis of factors affecting progression-free survival of nivolumab therapy in NSCLC patients

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	CI95%	p value	HR	CI95%	p value
Sex (female)*	1.86	0.73-4.74	0.19			
Age (years old)	0.97	0.92-1.03	0.33			
Total body weight (kg)	1.001	0.96-1.05	0.97			
ECOG performance status (>1)*	1.85	0.78-4.34	0.16			
Current/former Smoker	0.93	0.27-3.23	0.90			
Histological tumor type (adenocarcinoma)*	1.19	0.46-3.08	0.71			
Presence of mutation (yes)*	0.70	0.25-1.96	0.49			
Time to metastasis (days)	0.96	0.92-1.01	0.10			
Number of metastatic sites (>2)*	1.93	0.75-4.98	0.17			
Number of previous treatment line (>2)*	0.97	0.42-2.28	0.95			
Previous targeted therapy						
Tyrosine kinase inhibitors (no)*	0.87	0.29-2.60	0.80			
Bevacizumab (no)*	0.53	0.21-1.31	0.17			
Number of nivolumab cycles	0.68	0.53-0.86	0.0012			
Baseline biological characteristics						
C reactive protein/10 (mg/L)	1.19	1.05-1.35	0.0078	1.21	1.06-1.39	0.005
LDH (UI)	1.001	0.996-1.006	0.64			
Albumin (g/L)	0.91	0.80-1.02	0.10			
Neutrophils count/1000 (cells/mm ³)	1.45	1.19-1.76	0.0003	1.53	1.23-1.89	0.0001
Lymphocytes count/1000 (cells/mm ³)	0.63	0.32-1.23	0.18			
Neutrophils-lymphocytes ratio (NLR)	1.12	0.99-1.27	0.06			
CD3+ cells count/1000 (cells/mm ³)	0.62	0.27-1.45	0.27			
CD4+ cells count/1000 (cells/mm ³)	0.50	0.15-1.64	0.25			
CD8+ cells count/1000 (cells/mm ³)	0.40	0.06-2.56	0.33			

B cells count/100 (cells/mm³)	0.75	0.52-1.08	0.12			
NK count/100 (cells/mm³)	0.47	0.23-0.99	0.048			
Proportion of CD3+ cells (%)	1.002	0.999-1.006	0.18			
Proportion of CD4+ cells (%)	1.016	0.989-1.045	0.24			
Proportion of CD8+ cells (%)	0.995	0.960-1.032	0.79			
Proportion of NK cells (%)	0.984	0.939-1.031	0.50			
Proportion of B cells (%)	0.968	0.899-1.042	0.38			
Kinomic profile						
Baseline (cluster A)*	0.74	0.30-1.84	0.51			
Day 14 (cluster C)*	0.77	0.32-1.86	0.56			

CI95%, confidence interval 95% ; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; NK, natural Killer
* reference group

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de montrer que les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) étaient un tissu de substitution (au tissu tumoral) intéressant pour la future recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques. Pour cela deux modèles ont été utilisés : un modèle indirect qui a permis d'étudier les effets du sunitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase (TK) angiogénique qui possède des propriétés immunomodulatrices ; et un modèle direct qui consistait à étudier les effets du nivolumab dont la cible, le récepteur PD-1, se trouve à la surface des cellules immunitaires.

La première étude (Article 1) portait sur des patients atteints de carcinome rénal métastatique (CCRm) traités par sunitinib. Chaque patient a été prélevé et évalué au cours de 4 consultations lors du premier cycle de traitement : à J0 en pré-thérapeutique, à J7 et J21 après début du traitement, puis à J42 (ce qui correspond à la fin des 2 semaines de pause de traitement).

Dans un premier temps, l'étude des effets *ex vivo* du sunitinib sur l'activité des TK de CMSP de patients naïfs atteints de CCRm a permis de mettre en évidence une inhibition de nombreuses kinases par le sunitinib ainsi que son métabolite actif (le SU12662). Les profils d'inhibition TK *ex vivo* (obtenus par méthodologie « *on-chip* ») ont pu être associés d'une part, au score pronostic de Heng et d'autre part, au ratio lymphocytaire J21/J0. De manière intéressante, l'étude clinique rétrospective (première partie de l'article 1) a permis de montrer que le ratio lymphocytaire J21/J0 était associé à la survie sans progression (SSP) de patients CCRm traités par sunitinib, ce qui suggère un éventuel lien entre le profil d'inhibition *ex vivo* et la SSP. Cependant, nous n'avons pas pu étudier l'association entre les profils d'inhibition *ex vivo* et des critères de jugement cliniques tels que la SSP et la survie globale (SG) en raison de l'absence d'un nombre suffisant d'évènements (progression, décès). Une mise à jour de ces données est actuellement en cours afin d'évaluer le lien entre la survie et les profils d'inhibition *ex vivo*. D'autre part, l'analyse des profils kinomiques à J21 (état d'équilibre pharmacocinétique) est également en cours afin d'évaluer les effets *in vivo* pharmacodynamiques du sunitinib sur les CMSP et de les comparer aux profils d'inhibition *ex vivo* du sunitinib. De plus, ces profils d'inhibition à J21 seront confrontés à la SSP et la SG. Enfin, l'étude des profils à J7, J21 et J42 permettra de suivre les changements pharmacodynamiques au sein des CMSP tout au long d'un cycle de traitement. Les résultats *ex vivo* ayant montré une inhibition des TK, notre hypothèse de travail est qu'une inhibition *in vivo*

des TK par le sunitinib est attendue au cours du traitement avant un retour à un état équivalent à celui du J0 après 2 semaines de pause.

Le schéma posologique initialement recommandé pour le sunitinib est de 50 mg/j pendant 4 semaines suivies par 2 semaines de pause (schéma 4/2). Or, il a été montré que ce schéma posologique est à l'origine de 51 % de réduction de dose et d'arrêt définitif du traitement en raison de toxicités sévères³³¹. Dans ce contexte, des schémas d'administration alternatifs ont été récemment testés dans le but d'améliorer la tolérance au sunitinib³³². L'étude Rainbow a récemment montré qu'un schéma posologique d'administration du sunitinib pendant 2 semaines suivies d'une semaine de pause (schéma 2/1) permettait de réduire significativement la survenue des toxicités sévères sans pour autant en modifier l'efficacité³³³. Au vu des longues demi-vies du sunitinib (40-60 heures) et de son métabolite actif SU12662 (80-110 heures), l'état d'équilibre n'est pas atteint à J14 pour le schéma posologique 2/1, ce qui suggère une activité pharmacodynamique moindre qu'avec un schéma 4/2. L'analyse de l'évolution des profils kinomiques aux différents jours de traitement (tout particulièrement ceux de J7 et J21) associée à l'exposition plasmatique du sunitinib et du SU12662 pourrait permettre de mieux appréhender le schéma 2/1 en termes de pharmacodynamie.

La seconde étude clinique portait sur des patients atteints de cancer bronchiques non-à petites cellules (CBNPC) traités par nivolumab. L'évaluation de l'activité des sérine/thréonine kinases (STK) des CMSP 2 semaines après l'injection de nivolumab (J14) a permis de distinguer 2 groupes de patients (C et D) au sein de la cohorte. Le groupe C était caractérisé par une activation significativement plus importante de la protéine kinase Akt (protéine kinase B). Deux paramètres différencient les groupes C et D : un traitement antérieur par bevacizumab et le nombre de lymphocytes T (LT) CD8 circulants à J14.

Le bevacizumab pourrait être un facteur impliqué dans la modulation de l'activité d'Akt chez les patients traités par nivolumab, alors que la différence du nombre de LT CD8 serait plutôt une conséquence de cette modulation. Le bevacizumab est un anticorps qui se fixe au VEGF (*vascular endothelial growth factor*) empêchant ainsi l'activation de la voie du VEGF/VEGFR. Il en résulte une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur PD-1 à la surface des lymphocytes. En temps normal, l'interaction du PD-1 avec son ligand entraîne une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR responsable d'une diminution de la prolifération et de l'activation lymphocytaire. Le nivolumab va donc inhiber cette interaction et par conséquent entraîner une

activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Selon notre hypothèse, les patients n'ayant pas reçu précédemment de bevacizumab (groupe C) exprimeraient plus fortement le PD-1 à la surface de leurs lymphocytes. L'introduction du nivolumab entraînerait par conséquent une activation plus forte de la voie PI3K/Akt/mTOR chez ces patients. Toutefois, au sein du groupe D, deux sous-groupes peuvent être clairement distingués. Cependant, la répartition du nombre de patients précédemment traités par bevacizumab n'est pas statistiquement différente entre ces 2 sous-groupes, ce qui suggère l'existence d'autres facteurs susceptibles d'être impliqués dans la modulation d'Akt chez les patients traités par nivolumab. De plus, la SSP n'était pas significativement différente entre les groupes C et D. Les essais de Phase III dans le CBNPC ont montré que seule la SG était améliorée chez les patients traités par nivolumab par rapport au bras contrôle (chimiothérapie). Il serait donc intéressant d'étudier par la suite le lien entre profils d'inhibition et la SG, la médiane de la SG n'ayant pas été atteinte au cours de notre étude.

Par ailleurs, les patients précédemment traités par bevacizumab (groupe D) présentaient une inhibition de la voie Akt/mTOR, se caractérisant par un nombre environ 3 fois plus important de LT CD8 circulants par rapport au groupe C. Les lymphocytes T CD8 naïfs peuvent proliférer et générer des lymphocytes T CD8 mémoires, indépendamment d'une stimulation antigénique, en réponse aux cytokines IL-17 ou IL-15 ou secondairement à une lymphopénie. Cette prolifération des lymphocytes naïfs T CD8 indépendante d'une stimulation antigénique est nommée prolifération homéostatique et joue un rôle important dans le maintien du nombre de lymphocytes T CD8. Li *et al.* ont montré que mTOR avait un rôle central dans la réponse T CD8 induite par la prolifération homéostatique et dans l'immunité antitumorale ³²¹. Nos résultats confirment ces données puisque l'inhibition d'Akt et donc de mTOR était associée avec une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8. Pour soutenir notre hypothèse, il serait intéressant dans le futur d'effectuer à J0 et J14 des immunophénotypages permettant de distinguer et de quantifier les différentes sous-populations de LT CD8 (naïfs, effecteurs, mémoires) chez des patients CBNPC traités par nivolumab.

Ce travail est le premier à notre connaissance à étudier les profils kinomiques des CMSP et plus globalement de cellules circulantes. En effet, à ce jour tous les travaux concernant la recherche de biomarqueurs par approche kinomique dans le cancer ont été menés exclusivement à partir de tissu tumoral, provenant d'une biopsie ou d'une exérèse.

Au cours de nos deux études nous avons pu observer une différence entre les profils kinomiques des CMSP de volontaires sains et de patients. Ainsi, les patients atteints de carcinome rénal métastatiques (CCRm) présentaient des profils d'activité inférieurs à ceux observés chez les volontaires sains. En revanche, les patients ayant un cancer du poumon non-à petites cellules (CBNPC) présentaient une activité globale des kinases significativement plus forte que celle des volontaires sains. A première vue, ces résultats peuvent paraître contradictoires alors que ces patients partagent une caractéristique physiologique commune, une forte exposition plasmatique au VEGF par rapport aux volontaires sains^{225,334}. Le VEGF est connu pour induire l'expression de protéines de co-stimulations inhibitrices, tel que le PD-1, à la surface des lymphocytes^{307,335}. Ces récepteurs inhibiteurs sont responsables d'une inhibition de voies de signalisations entraînant l'anergie des lymphocytes. En *baseline*, les patients CCRm présentent plutôt une activité globale faible des kinases et les patients CBNPC une activité globale plus forte. Plusieurs arguments pourraient expliquer ces différences de profils. Premièrement, les kinases étudiées au sein de ces deux cohortes étaient d'une part, les TK chez les patients CCRm et d'autre part, les STK chez les patients CBNPC. Deuxièmement, les patients CCRm étaient naïfs de tout traitement contrairement aux patients CBNPC. En effet, ces derniers avaient tous reçu au moins une première ligne de traitement avant l'initiation du nivolumab, et principalement un sel de platine. Or, les sels de platine sont connus pour activer la voie Akt/mTOR aussi bien au sein de la tumeur que des lymphocytes³¹⁴. De plus, 39 % des patients CBNPC avaient également reçu du bevacizumab en dernière ligne de traitement avant de débiter le nivolumab. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A, ce qui entraîne une diminution du taux de PD-1 lymphocytaire et par conséquent une augmentation de l'activité des kinases. Ainsi, l'administration de bevacizumab pourrait être en partie responsable de l'activité kinomique supérieure observée chez les patients CBNPC par rapport aux volontaires sains, et ce d'autant plus que les voies inhibées par le PD-1 impliquent essentiellement des STK. Dans ce contexte, il semble donc difficile de comparer les profils kinomiques de CMSP de nos patients CCRm et CBNPC. Pour répondre à cette question, il serait intéressant dans le futur d'évaluer les profils kinomiques de CMSP chez des patients CBNPC naïfs de tout traitement, afin de pouvoir comparer leurs activités TK et STK à celles de nos patients CCRm.

Lors de l'étude N°3, nous avons pu clairement identifier à partir des profils kinomiques les patients CBNPC des volontaires sains, ce qui n'avait pas été le cas avec les patients atteints de CCRm. Ce résultat peut paraître surprenant puisque la cohorte de patients CBNPC était bien plus hétérogène sur de nombreux points (histologie, présence de mutation activatrice, lignes de

traitement) que celle des patients CCRm. Ceci soulève la question de savoir si cette différence de profil kinomique entre les volontaires sains et les patients CBNPC est liée à aux caractéristiques physiopathologiques du CBNPC ou aux lignes de traitements antérieures qui pourraient directement impacter les voies de signalisation intra-lymphocytaires des patients CBNPC. Seule la comparaison des profils kinomiques des activités STK de patients naïfs atteints de CBNPC à ceux des volontaires sains permettrait de répondre à cette question.

La méthodologie « *on-chip* » consiste à mettre en contact directement sur la puce, l'échantillon du patient avec un inhibiteur de kinases (TK ou STK en fonction du type de puce utilisée). L'objectif de cette méthodologie est de diminuer la variation interindividuelle observée initialement chez les patients, en partie liée à un « effet puce ». Bien que la majorité des travaux rapportés dans la littérature utilisent cette méthodologie pour la recherche de biomarqueurs dans le cancer, de nombreuses questions subsistent.

Lors de notre première étude chez les patients CCRm, la méthodologie « *on-chip* » a été appliquée. Toutefois, aucun regroupement de patient n'a pu être réalisé. Le manque de puissance statistique (n=21 patients) pourrait expliquer en partie ce résultat. D'autre part, le choix de l'inhibiteur de kinase déposé sur la puce ainsi que sa concentration pourrait également expliquer ce résultat. Tout d'abord, il est important de rappeler que la méthodologie « *on-chip* » permet d'identifier un biomarqueur pronostique et non prédictif. Dans ce contexte, le choix de la drogue utilisée pour la méthodologie « *on-chip* » peut être différent du traitement proposé au patient. Pour exemple, Hilhorst *et al.* ont utilisé du sunitinib pour prédire la réponse de patients CBNPC traités par erlotinib ¹³⁴. De même, Tahiri *et al.* ont effectué à partir de biopsies tumorales de mélanome des tests *on-chip* sur des puces à TK avec du vemurafenib (un inhibiteur de BRAF) et du sunitinib. Seules les analyses *ex vivo* avec le vemurafenib ont permis de distinguer les tumeurs sauvages des tumeurs mutées BRAFV600E ¹³⁹. Le sunitinib est un inhibiteur multikinase assez peu spécifique ⁷⁰. Les arbres kinomiques proposés dans notre étude N°1 ont permis de confirmer ce point et de mettre également en évidence la faible spécificité du SU12662 (métabolite actif). Dans ce contexte, l'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique tel que le sorafenib (voir Figure 13, Chapitre 1) aurait peut être permis d'identifier différents groupes chez les patients CCRm. Par ailleurs, le choix de la concentration d'inhibiteur est probablement un point critique. Ainsi, le sunitinib a été utilisé à la concentration de 2,5 µM et de 7,5 µM pour l'étude *on-chip* de tissu de cancer colorectal ¹³² et de mélanome ¹³⁹, respectivement. Ceci suggère que la concentration d'inhibiteur à utiliser est dépendante du type de tissu étudié. Cependant, il est important de souligner que ces

concentrations de sunitinib ne sont probablement pas retrouvées au sein de la tumeur. Prenons pour exemple notre utilisation du sunitinib avec les CMSP : une concentration de sunitinib de 125 nM (50 ng/mL) est attendue dans le plasma à la posologie de 50 mg/j. Or le sunitinib est fixé à 95 % aux protéines plasmatiques, ce qui signifie que la concentration libre de sunitinib attendue dans le plasma est de l'ordre de 6,25 nM. Il est donc fort probable de retrouver une concentration intra-lymphocytaire plus faible encore en raison des phénomènes d'efflux liés à la Pgp dont le sunitinib est substrat. Dans notre article 1, nous avons utilisé une concentration de 1 μ M, soit 160 fois plus importante. Les effets *ex vivo* du sunitinib ne sont donc probablement pas ceux retrouvés *in vivo*.

La confrontation des résultats de la méthodologie « *on-chip* » à ceux des profils d'inhibition à J21/J0 des patients CCRm traités par sunitinib permettra de clarifier en partie ce sujet. L'ensemble de ces données souligne que ces études « *on-chip* » pour la recherche de biomarqueurs requièrent le choix du bon inhibiteur à la juste concentration. Différents inhibiteurs devraient donc être testés en amont selon des études effet-dose afin de répondre à cette problématique. Toutefois, le prix onéreux des puces reste un facteur limitant à la réalisation de ce type de test.

La méthodologie « *on-chip* » n'a pas pu être appliquée pour le nivolumab étant donné sa nature d'anticorps qui risquait d'une part d'entraîner des interférences avec les anticorps employés pour la détection de phosphorylation des peptides, mais surtout par le fait que son mécanisme d'action ne passe pas par l'inhibition directe de kinases. Pour l'étude N°3 menée chez les patients CBNPC, nous avons donc tenté d'appliquer la méthodologie « *on-chip* » en utilisant du vemurafenib (inhibiteur spécifique de BRAF). Il s'est avéré qu'à de faibles concentrations (entre 1 et 10 μ M), le vemurafenib avait très peu d'effet sur le profil d'activité des STK des CMSP. L'utilisation de plus fortes concentrations (40 et 80 μ M) a entraîné une inhibition de nombreuses kinases, mais avec une forte variabilité intra-échantillon probablement liée à des problèmes de solubilité du vemurafenib. Ces essais ont malheureusement rapidement été abandonnés pour une raison de coût des puces. Au cours de l'étude N°3, des ratios entre les profils kinomiques obtenus en *baseline* (J0) et à 14 jours après la première injection de nivolumab (J14) ont été déterminés. Cette méthode « *in vivo* » présente deux avantages majeurs. D'une part, chaque patient est son propre témoin ; d'autre part, elle permet d'observer l'effet pharmacodynamique *in vivo* du médicament. De cette façon, deux groupes distincts (C et D) de patients ont été identifiés en fonction de leur profil d'inhibition sous nivolumab. Bien qu'aucune association n'ait été observée avec la réponse clinique (SSP, réponse objective), la caractérisation des deux groupes doit être approfondie aussi bien en termes d'efficacité clinique (survie globale) que de toxicités de type auto-immunes. Au

total, cette méthode « *in vivo* » pourrait permettre de déterminer des biomarqueurs pharmacodynamiques précoces de réponse (efficacité, toxicité) au traitement. Son désavantage reste néanmoins la nécessité d'administrer le traitement en dépit du fait que ce dernier puisse s'avérer inefficace ou toxique précocement.

Différents facteurs tels que l'exposition plasmatique au médicament, l'expression du PD-1 sur le lymphocyte (comme précédemment évoqué, en relation avec l'administration antérieure de bevacizumab) pourraient contribuer à la variabilité interindividuelle des profils d'inhibition STK observés à J14 chez les patients CBNPC traités par nivolumab. Afin d'étudier l'influence de l'exposition plasmatique au nivolumab sur le profil d'inhibition STK, il a été nécessaire de développer une technique ELISA permettant de quantifier le nivolumab plasmatique chez ces patients (Article 2). Cette technique reproductible et spécifique a permis de mettre en évidence l'absence de différence significative d'exposition plasmatique entre les 2 groupes C et D, suggérant que les différences de profils kinomiques sont inhérentes aux CMSP et non à la concentration circulante du médicament. De la même manière, la concentration plasmatique de sunitinib et de SU12662 a été déterminée à J21 par chromatographie liquide chez les patients de l'étude N°1³³⁶. De ce fait, l'exposition plasmatique au médicament pourra être prise en compte dans la future analyse des profils d'inhibition à J21 chez les patients CCRm traités par sunitinib. Enfin, l'expression du PD-1 sur les lymphocytes circulants pourrait également contribuer à la variabilité interindividuelle des profils d'inhibition STK observés à J14 chez les patients CBNPC traités par nivolumab. Il serait intéressant dans le futur de quantifier par Western Blot l'expression du PD-1 et de relier cette expression au profil d'inhibition à J14 pour étayer cette hypothèse.

La question se pose de l'utilisation en pratique clinique des profils kinomiques de CMSP chez des patients traités par thérapie ciblée ou immunothérapie comme biomarqueur pharmacodynamique. En effet, des outils plus simples existent aujourd'hui. Ainsi pour le sunitinib, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) qui consiste à quantifier les concentrations plasmatiques du sunitinib et du SU12662, représente actuellement le meilleur outil à disposition pour optimiser la prise en charge thérapeutique. Concernant le nivolumab, l'expression immunohistochimique du PD-L1 semble être le meilleur candidat aujourd'hui. Toutefois ces outils simples présentent des limites. Bien que le STP soit un marqueur pharmacodynamique, il ne traduit pas toujours l'effet du sunitinib sur sa cible. D'ailleurs, les études PK/PD peinent à montrer une relation entre l'exposition plasmatique et l'efficacité clinique. Le taux d'expression de PD-L1 n'est pas un marqueur dynamique et ne reflète donc pas l'effet du nivolumab sur les lymphocytes. La

recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques reste donc toujours d'actualité pour ces deux médicaments.

Ce travail a permis, par le biais de 2 modèles, de démontrer que l'approche kinomique pourrait être une technique intéressante pour évaluer les effets pharmacodynamiques du médicament en utilisant les CMSP comme matrice biologique. Cependant, dans un contexte de recherche translationnelle, il est nécessaire que ce procédé soit utilisable en routine afin de guider les cliniciens dans la prise en charge personnalisée des patients. L'isolement des CMSP est simple, facilement accessible, peu invasif pour le patient et peu coûteux. Cependant, cette technique reste chronophage pouvant, de ce fait, nécessiter du personnel dédié. Une alternative serait l'utilisation de tubes CPT (*cell preparation tube*) lors du prélèvement, permettant de séparer immédiatement les CMSP des autres cellules sanguines. Ces 2 méthodes permettent un isolement équivalent et de haute qualité des CMSP ³³⁷. Cependant, les tubes CPT restent plus coûteux que la technique classique du Ficoll. Par ailleurs, le coût d'une puce PamChip[®] est de l'ordre de 450 euros soit environ 100 euros par puits. Ceci peut paraître onéreux, mais reste tout à fait raisonnable et est à mettre en regard du prix du traitement médicamenteux et donc également des économies résultant du choix d'un traitement mieux adapté initialement.

De manière générale, une des limites de la kinomique est la standardisation de l'analyse et l'interprétation des données générées. Afin de répondre à ces problématiques la société PamGene a créé le logiciel BioNavigator[®], un outil permettant la « visualisation » des données et d'effectuer des analyses statistiques variées. Ce logiciel est uniquement disponible chez PamGene, il est donc non accessible en ligne et payant contrairement au Bioconductor ³³⁸ par exemple, qui est un logiciel gratuit disponible en ligne pour le traitement de données provenant d'analyses génomiques. De plus, l'utilisation du BioNavigator[®] requiert des compétences en bioinformatique, rendant difficilement accessible le traitement des données par des biologistes sans formation préalable par PamGene.

L'approche kinomique permet de mesurer l'activité de kinases, cependant cette activité est dépendante de nombreuses régulations (transcriptionnelles et post-transcriptionnelle par exemple) ¹¹⁰. Ceci souligne la nécessité de combiner les données de kinomiques avec des données provenant de différentes techniques « omiques » ainsi que les données cliniques et histologiques du patient. Cette vue d'ensemble permettrait une prise en charge optimale des patients atteints de cancer.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de doctorat est le premier à explorer la faisabilité et l'intérêt d'utiliser des CMSP comme matrice biologique pour la recherche future de biomarqueurs pharmacodynamiques par approche kinomique chez des patients traités par thérapie ciblée ou immunothérapie. Notre étude menée chez des patients atteints de CCRm a permis de montrer que le sunitinib (antiangiogénique) et son métabolite actif (SU12662) inhibaient *ex vivo* l'ensemble des TK des CMSP. De plus, les profils d'inhibition *ex vivo* étaient associés au score pronostic de Heng ainsi qu'au ratio lymphocytaire J21/J0. L'étude menée chez des patients atteints de CBNPC traités par nivolumab (inhibiteur de *checkpoint* immunitaire) a permis d'étudier les effets pharmacodynamiques *in vivo* du nivolumab sur les STK de CMSP. Après une perfusion unique de nivolumab, deux types de profils caractérisés par une variabilité interindividuelle de l'activité de protéine Akt ont pu être identifiés. Un traitement antérieur par bevacizumab pourrait être un facteur contribuant à cette modulation de l'activité de la voie Akt/mTOR, et le nombre de LT CD8 circulants une conséquence de la modulation de l'activité de cette voie.

L'ensemble de ces travaux permet de valider notre choix d'utiliser des CMSP pour la recherche future de biomarqueurs pharmacodynamiques par approche kinomique. Dans un contexte de médecine de précision, ces résultats ouvrent la voie vers l'utilisation de l'approche kinomique comme outil d'optimisation et de suivi des traitements ciblés antitumoraux. Néanmoins, la réalisation d'études cliniques selon les critères de recommandations REMARK reste une étape préalable pour pouvoir identifier des biomarqueurs prédictifs par approche kinomique au sein de CMSP chez des patients traités par thérapie ciblée ou immunothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Krebs, E. G. An accidental biochemist. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, xii–xxxii (1998).
2. Burnett, G. & Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* **211**, 969–980 (1954).
3. Sutherland, E. W. & Wosilait, W. D. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169–70 (1955).
4. Arena, S., Benvenuti, S. & Bardelli, A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell. Mol. life Sci.* **62**, 2092–9 (2005).
5. Graves, J. D. & Krebs, E. G. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. ans Ther.* **82**, 111–21 (1999).
6. Adams, J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2271–90 (2001).
7. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (80-.)*. **298**, 1912–1934 (2002).
8. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–90 (2007).
9. Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M. R. & Cooper, C. S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **10**, (2010).
10. Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995).
11. Sharma, K. *et al.* Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep.* **8**, 1583–94 (2014).
12. Dhanasekaran, N. & Premkumar Reddy, E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**, 1447–1455 (1998).
13. Übersax, J. a & Ferrell, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 530–41 (2007).
14. Eglén, R. M. & Reisine, T. The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev. Technol.* **7**, 22–43 (2009).
15. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–65 (2001).
16. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000).
17. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–99 (2004).
18. Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170–3 (1976).
19. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
20. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
21. Futreal, P. A. *et al.* A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 177–83 (2004).
22. Vignot, S. *Thérapies moléculaires ciblées: de la biologie aux applications cliniques. Montrouge: J. Libbey Eurotext.* (2008).
23. Krause, D. S. & Van Etten, R. A. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172–187 (2005).
24. Smith, K. M., Yacobi, R. & Van Etten, R. A. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol. Cell* **12**, 27–37 (2003).
25. Nakao, M. *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**, 1911–8 (1996).
26. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
27. Parsons, R. & Simpson, L. PTEN and cancer. *Methods Mol. Biol.* **222**, 147–66 (2003).
28. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
29. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
30. Matsumoto, T. & Mugishima, H. Signal Transduction via Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors and Their Roles in Atherogenesis. *J. Atheroscler. Thromb.* **13**, 130–135 (2006).
31. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem. bioch* **153**, 13–19 (2013).
32. Ferrara, N., Gerber, H. & Lecouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676 (2003).
33. Li, Y.-L., Zhao, H. & Ren, X.-B. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol. Med.* **13**, 206–14 (2016).
34. Hicklin, D. J. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1011–1027 (2004).
35. Rivera, S. *et al.* Thérapies ciblées et radiothérapie dans les cancers bronchiques non à petites cellules. *Cancer/Radiothérapie* **15**, 527–535 (2011).
36. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
37. Coley, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.* **3**, 1–48 (1910).
38. Bui, J. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current Opinion in Immunology* **19**, 203–208 (2007).
39. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–11 (2001).
40. Gatti, R. A. & Good, R. A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* **28**, 89–98 (1971).

41. Imai, K. *et al.* Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* **103**, 456–64 (2004).
42. Xavier, A. C. & Taub, J. W. Acute leukemia in children with Down syndrome. *Haematologica* **95**, 1043–5 (2010).
43. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* **370**, 59–67 (2007).
44. Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: A National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5323–5337 (2009).
45. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
46. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (80-)*. **331**, 1565–70 (2011).
47. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
48. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
49. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-)*. **331**, 1565–1570 (2011).
50. Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell. Physiol.* **195**, 346–55 (2003).
51. Disis, M. L. Immune regulation of cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 4531–4538 (2010).
52. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
53. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
54. Ceeraz, S., Nowak, E. C. & Noelle, R. J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* **34**, 556–563 (2013).
55. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
56. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–29 (2009).
57. Lesokhin, A. M., Callahan, M. K., Postow, M. A. & Wolchok, J. D. On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci. Transl. Med.* **7**, 280sr1 (2015).
58. Herbst, R. S. *et al.* A study of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic tumors. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2013 (suppl. abstr 3000) 1375842 (2013).
59. Azuma, T. *et al.* B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**, 3635–3643 (2008).
60. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).
61. Parsa, A. T. *et al.* Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* **13**, 84–8 (2007).
62. Hebeisen, M. *et al.* SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *J. Clin. Invest.* **123**, 1044–56 (2013).
63. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–17 (2012).
64. Riley, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* **229**, 114–25 (2009).
65. Chinai, J. M. *et al.* New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences* **36**, 587–595 (2015).
66. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
67. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* **14**, 1212–8 (2013).
68. Weinstein, I. B. Addiction to Oncogenes — the Achilles Heal of Cancer. *Science (80-)*. **297**, 63–64 (2002).
69. Tokuda, Y., Ohta, M., Suzuki, Y., Kubota, M. & Tajima, T. Clinical development of trastuzumab in breast cancer. *Breast cancer* **8**, 93–7 (2001).
70. Karaman, M. W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **26**, 127–32 (2008).
71. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
72. Romanetto, J. Interêts des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. (Nancy, 2011).
73. Gruttola, V. G. De *et al.* Considerations in the Evaluation of Surrogate Endpoints in Clinical Trials: Summary of a National Institutes of Health Workshop. *Control. Clin. Trials* **22**, 485–502 (2001).
74. National Cancer Institute. Dictionary of cancer terms. *National Cancer Institute. Dictionary of cancer terms.*
75. Jain, R. K. *et al.* Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 327–38 (2009).
76. Hanash, S. M., Baik, C. S. & Kallioniemi, O. Emerging molecular biomarkers—blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 142–150 (2011).
77. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 845–856 (2005).
78. Guide Méthodologique. Test compagnon associé à une thérapie ciblée : définitions et méthode d'évaluation. (2014).
79. Institut National Du Cancer. Les tests ou marqueurs déterminant l'accès à des thérapies ciblées. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-tests-moleculaires/Les-tests-ou-marqueurs-determinant-l-acces-a-des-therapies-ciblees>.
80. Oxnard, G. R. *et al.* 135O_PR: Plasma genotyping for predicting benefit from osimertinib in patients (pts) with advanced NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **11**, S154 (2016).
81. Novello, S. *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **27**, v1–v27 (2016).

82. Jayson, G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M. & Harris, A. L. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* **388**, 518–29 (2016).
83. Hasan, J., Byers, R. & Jayson, G. C. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br. J. Cancer* **86**, 1566–77 (2002).
84. Zhu, A. X. *et al.* Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3027–35 (2009).
85. Sorensen, A. G. *et al.* A “vascular normalization index” as potential mechanistic biomarker to predict survival after a single dose of cediranib in recurrent glioblastoma patients. *Cancer Res.* **69**, 5296–300 (2009).
86. O’Connor, J. P. B. & Jayson, G. C. Do imaging biomarkers relate to outcome in patients treated with VEGF inhibitors? *Clinical Cancer Research* **18**, 6588–98 (2012).
87. Meng, X., Huang, Z., Teng, F., Xing, L. & Yu, J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 868–876 (2015).
88. Yearley, J. H., Gibson, C. & Yu, N. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Eur. Cancer Congr. 51, 2015 (suppl, abstr 18LBA)*
89. Taube, J. M. *et al.* Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.* **20**, 5064–74 (2014).
90. Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* **387**, 1909–1920 (2016).
91. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–7 (2014).
92. Ribas, A. *et al.* Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol* **33**, 2015 (suppl, abstr 3001)
93. Dronca, R. S. *et al.* Bim as a predictive T-cell biomarker for response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol* **33**, 2015 (suppl, Abstr 9013)
94. Chen, D. S., Irving, B. A. & Hodi, F. S. Molecular pathways: Next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin. Cancer Res.* **18**, 6580–6587 (2012).
95. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–35 (2015).
96. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
97. Rousseau, B. *et al.* Immunothérapies et thérapies ciblées en oncologie médicale: rationnel d’essai d’association et perspectives. *Bull. Cancer* **101**, 31–39 (2014).
98. Kulasingam, V. & Diamandis, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 588–99 (2008).
99. Yuan, J. *et al.* Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J. Immunother. cancer* **4**, 3 (2016).
100. Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113–27 (2000).
101. Kobe, B. & Kemp, B. E. Active site-directed protein regulation. *Nature* **402**, 373–6 (1999).
102. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245–54 (2003).
103. Proudfoot, N. J., Furger, A. & Dye, M. J. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**, 501–12 (2002).
104. Gebauer, F. & Hentze, M. W. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 827–35 (2004).
105. Johnson, S. a & Hunter, T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat. Methods* **2**, 17–25 (2005).
106. Piersma, S. R., Labots, M., Verheul, H. M. W. & Jiménez, C. R. Strategies for kinome profiling in cancer and potential clinical applications: chemical proteomics and array-based methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3163–71 (2010).
107. Arsenault, R., Griebel, P. & Napper, S. Peptide arrays for kinome analysis: new opportunities and remaining challenges. *Proteomics* **11**, 4595–609 (2011).
108. Hennig, E. E., Mikula, M., Rubel, T., Dadlez, M. & Ostrowski, J. Comparative kinome analysis to identify putative colon tumor biomarkers. *J. Mol. Med.* **90**, 447–456 (2012).
109. Parikh, K. & Peppelenbosch, M. P. Kinome profiling of clinical cancer specimens. *Cancer Res.* **70**, 2575–8 (2010).
110. Sikkema, A. H., den Dunnen, W. F. a, Diks, S. H., Peppelenbosch, M. P. & de Bont, E. S. J. M. Optimizing targeted cancer therapy: Towards clinical application of systems biology approaches. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **82**, 171–186 (2012).
111. Sugiyama, N. & Ishihama, Y. Large-Scale Profiling of Protein Kinases for Cellular Signaling Studies by Mass Spectrometry and Other Techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **130**, 264–272 (2016).
112. Jalal, S., Kindrachuk, J. & Napper, S. Phosphoproteome and Kinome Analysis: Unique Perspectives on the Same Problem. *Curr. Anal. Chem.* **3**, 1–15 (2007).
113. Mann, M. *et al.* Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261–8 (2002).
114. Kalume, D. E., Molina, H. & Pandey, A. Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 64–9 (2003).
115. Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665–85 (2004).
116. Ouyang, Z. *et al.* Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions. *Science (80-.)*. **301**, 1351–4 (2003).
117. Houseman, B. T., Huh, J. H., Kron, S. J. & Mrksich, M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat. Biotechnol.* **20**, 270–4 (2002).
118. Peppelenbosch, M. P. Kinome profiling. *Scientifica (Cairo)*. **2012**, 306798 (2012).
119. Rinie van Beuningen, Henk van Damme, Piet Boender, Niek Bastiaensen, Alan Chan, T. K. Fast and Specific Hybridization Using Flow-Through Microarrays on Porous Metal Oxide. *Clin. Chem.* **47**, 1931–1933 (2001).
120. Gershon D 2004 Nature 432 243-249.

121. Sanz, A. *et al.* Analysis of Jak2 catalytic function by peptide microarrays: the role of the JH2 domain and V617F mutation. *PLoS One* **6**, e18522 (2011).
122. Sanz Sanz, A. *et al.* The JH2 domain and SH2-JH2 linker regulate JAK2 activity: A detailed kinetic analysis of wild type and V617F mutant kinase domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 1835–41 (2014).
123. De Keersmaecker, K., Versele, M., Cools, J., Superti-Furga, G. & Hantschel, O. Intrinsic differences between the catalytic properties of the oncogenic NUP214-ABL1 and BCR-ABL1 fusion protein kinases. *Leukemia* **22**, 2208–2216 (2008).
124. Kuijjer, M. L. *et al.* Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy. *BMC Med. genomic* **8**, (2014).
125. Ree, A. H. *et al.* Tumor phosphatidylinositol-3-kinase signaling and development of metastatic disease in locally advanced rectal cancer. *PLoS One* **7**, e50806 (2012).
126. Maat, W. *et al.* Episodic Src activation in uveal melanoma revealed by kinase activity profiling. *Br. J. Cancer* **101**, 312–9 (2009).
127. Røe, K. *et al.* Hypoxic tumor kinase signaling mediated by STAT5A in development of castration-resistant prostate cancer. *PLoS One* **8**, e63723 (2013).
128. Vivanco, I. *et al.* The phosphatase and tensin homolog regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6459–64 (2010).
129. Eriksson, A. *et al.* AKN-028 induces cell cycle arrest, downregulation of Myc associated genes and dose dependent reduction of tyrosine kinase activity in acute myeloid leukemia. *Biochem. Pharmacol.* **87**, 284–91 (2014).
130. PamGene. Available at: www.pamgene.com.
131. Versele, M. *et al.* Response prediction to a multitargeted kinase inhibitor in cancer cell lines and xenograft tumors using high-content tyrosine peptide arrays with a kinetic readout. *Mol Cancer Ther* **8**, 1846–1855 (2009).
132. Saelen, M. G. *et al.* Tumor kinase activity in locally advanced rectal cancer: Angiogenic signaling and early systemic dissemination. *Angiogenesis* **14**, 481–489 (2011).
133. Folkvord, S. *et al.* Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by multiplex kinase activity profiling. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78**, 555–562 (2010).
134. Hilhorst, R. *et al.* Application of kinase activity profiles to predict response to erlotinib in a neoadjuvant setting in early stage non-small-cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* **28**, 2011 (suppl, abstr 10566)
135. Hilhorst, R. *et al.* Blind prediction of response to erlotinib in early stage non-small cell lung cancer (NSCLC) in a neoadjuvant setting based on kinase activity profiles. *J Clin Oncol* **29**, 2010 (suppl, abstr 10521)
136. Anderson, J. C. *et al.* High Throughput Kinomic Profiling of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma Identifies Kinase Activity Dependent Molecular Subtypes. *PLoS One* **10**, e0139267 (2015).
137. Anderson, J. C. *et al.* Kinomic exploration of temozolomide and radiation resistance in Glioblastoma multiforme xenolines. *Radiother. Oncol.* **111**, 468–74 (2014).
138. Anderson, J. C. *et al.* Kinomic alterations in atypical meningioma. *Med. Res. Arch.* **2015**, (2015).
139. Tahiri, A. *et al.* Differential Inhibition of Ex-Vivo Tumor Kinase Activity by Vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF Wild-Type Metastatic Malignant Melanoma. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
140. Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H. & Williams, K. C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytom. Part A* **77**, 410–419 (2010).
141. Burczynski, M. E. & Dorner, A. J. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics* **7**, 187–202 (2006).
142. Liew, C.-C. *et al.* The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J. Lab. Clin. Med.* **147**, 126–132 (2006).
143. Twine, N. C. *et al.* Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 6069–6075 (2003).
144. Bluth, M., Lin, Y.-Y., Zhang, H., Viterbo, D. & Zenilman, M. Use of gene expression profiles in cells of peripheral blood to identify new molecular markers of acute pancreatitis. *Arch. Surg.* **143**, 227-233-234 (2008).
145. Baine, M. J. *et al.* Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One* **6**, e17014 (2011).
146. Institut de veille sanitaire. Available at: www.invs.sante.fr. (Accessed: 3rd September 2015)
147. Escudier, B. *et al.* Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25 suppl 3**, iii49-iii56 (2014).
148. Kuroda, N. & Tanaka, A. Recent classification of renal epithelial tumors. *Med. Mol. Morphol.* **47**, 68–75 (2014).
149. Srigley, J. R. *et al.* The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* **37**, 1469–1489 (2013).
150. Méjean, A. & Lebreton, T. Prise en charge du cancer rénal métastatique. *Progrès en Urol.* **18**, S298–S308 (2008).
151. Patard, J. J. *et al.* [CCAFU Recommendations 2013: Renal cancer]. *Progrès en Urol.* **23 Suppl 2**, S177–204 (2013).
152. Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, G. T., Lopez-Beltran, A. & Montironi, R. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* **40**, 10–29 (2009).
153. LaGory, E. L. & Giaccia, A. J. The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nat. Cell Biol.* **18**, 356–65 (2016).
154. Semenza, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 167–71 (2001).
155. Cohen, H. T. & McGovern, F. J. Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2477–2490 (2005).
156. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489–501 (2002).
157. Hay, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **8**, 179–83 (2005).
158. Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**, 5527–41 (2008).
159. Engelman, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 550–62

- (2009).
160. Shen, K. *et al.* Notoginsenoside Ft1 promotes angiogenesis via HIF-1 α mediated VEGF secretion and the regulation of PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 784–92 (2012).
 161. Ljungberg, B. *et al.* EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur. Urol.* **67**, 913–24 (2015).
 162. Heng, D. Y. C. *et al.* Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5794–5799 (2009).
 163. Rini, B. I. & Atkins, M. B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet. Oncol.* **10**, 992–1000 (2009).
 164. Brotelle, T. & Bay, J. O. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR: Description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bull. Cancer* **103**, 18–29 (2016).
 165. Santoni, M. *et al.* Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor. *Int. J. cancer* **134**, 2772–7 (2014).
 166. Farolfi, A. *et al.* Pharmacokinetics pharmacodynamics and clinical efficacy of nivolumab in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. **5255**, (2016).
 167. Yang, J. C. & Childs, R. Immunotherapy for renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5576–83 (2006).
 168. Coppin, C. *et al.* Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane database Syst. Rev.* CD001425 (2005). doi:10.1002/14651858.CD001425.pub2
 169. Motzer, R. *et al.* Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1–11 (2015). doi:10.1056/NEJMoa1510665
 170. Roskoski, R. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 323–8 (2007).
 171. Di Gion, P. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin Pharmacokinet* **50**, 551–603 (2011).
 172. van Erp, N. P., Gelderblom, H. & Guchelaar, H. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* **35**, 692–706 (2009).
 173. European Medicine Agency. Summary of product characteristics: Sutent. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000687/WC500057737.pdf. (Accessed: 10th January 2016)
 174. Kloth, J. S. L. *et al.* Relationship Between Sunitinib Pharmacokinetics and Administration Time: Preclinical and Clinical Evidence. *Clin. Pharmacokinet.* **54**, 851–8 (2015).
 175. Houk, B. E., Bello, C. L., Kang, D. & Amantea, M. A population pharmacokinetic meta-analysis of sunitinib malate (SU11248) and its primary metabolite (SU12662) in healthy volunteers and oncology patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2497–506 (2009).
 176. Yu, H. *et al.* Integrated semi-physiological pharmacokinetic model for both sunitinib and its active metabolite SU12662. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 809–19 (2015).
 177. Gao, B. *et al.* Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J. Clin. Oncol.* **30**, 4017–25 (2012).
 178. Motzer, R. J. *et al.* Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3584–90 (2009).
 179. de Wit, D., Guchelaar, H.-J., den Hartigh, J., Gelderblom, H. & van Erp, N. P. Individualized dosing of tyrosine kinase inhibitors: are we there yet? *Drug Discov. Today* **20**, 18–36 (2015).
 180. Houk, B. E. *et al.* Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 357–71 (2010).
 181. Narjoz, C. *et al.* Role of the lean body mass and of pharmacogenetic variants on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sunitinib in cancer patients. *Invest. New Drugs* (2014).
 182. Faivre, S. *et al.* Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 25–35 (2006).
 183. Noda, S. *et al.* Assessment of Sunitinib-Induced Toxicities and Clinical Outcomes Based on Therapeutic Drug Monitoring of Sunitinib for Patients With Renal Cell Carcinoma. *Clin. Genitourin. Cancer* **13**, 350–8 (2015).
 184. Diekstra, M. H. M. *et al.* Association analysis of genetic polymorphisms in genes related to sunitinib pharmacokinetics, specifically clearance of sunitinib and SU12662. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 81–9 (2014).
 185. Teo, Y. L. *et al.* Association of drug exposure with toxicity and clinical response in metastatic renal cell carcinoma patients receiving an attenuated dosing regimen of sunitinib. *Target. Oncol.* **10**, 429–37 (2015).
 186. Mizuno, T. *et al.* The effect of ABCG2 genotype on the population pharmacokinetics of sunitinib in patients with renal cell carcinoma. *Ther. Drug Monit.* **36**, 310–6 (2014).
 187. Nagata, M. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of sunitinib-induced thrombocytopenia in Japanese patients with renal cell carcinoma. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 402–10 (2015).
 188. Porta, C. *et al.* Primary resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced renal cell carcinoma: state-of-the-science. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **12**, 1571–7 (2012).
 189. Motzer, R. J. & Bukowski, R. M. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5601–8 (2006).
 190. Widmer, N. *et al.* Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two—targeted therapies. *Eur. J. Cancer* **50**, 2020–36 (2014).
 191. Huillard, O. *et al.* Sarcopenia and body mass index predict sunitinib-induced early dose-limiting toxicities in renal cancer patients. *Br. J. Cancer* **108**, 1034–41 (2013).
 192. Chae, J. woo *et al.* BSA and ABCB1 polymorphism affect the pharmacokinetics of sunitinib and its active metabolite in Asian mRCC patients receiving an attenuated sunitinib dosing regimen. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **78**, 1–10 (2016).
 193. Sugiyama, M. *et al.* Sorafenib and sunitinib, two anticancer drugs, inhibit CYP3A4-mediated and activate CY3A5-mediated midazolam 1'-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 757–62 (2011).

194. Blanco, J. G. *et al.* Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* **12**, 605–11 (2002).
195. Tang, S. C. *et al.* Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int. J. cancer* **130**, 223–33 (2012).
196. Thomas-Schoemann, A. *et al.* Drug interactions with solid tumour-targeted therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89**, 179–96 (2014).
197. van Leeuwen, R. W. F., van Gelder, T., Mathijssen, R. H. J. & Jansman, F. G. A. Drug-drug interactions with tyrosine-kinase inhibitors: a clinical perspective. *Lancet. Oncol.* **15**, e315–26 (2014).
198. Hamberg, P. *et al.* Decreased exposure to sunitinib due to concomitant administration of ifosfamide: results of a phase I and pharmacokinetic study on the combination of sunitinib and ifosfamide in patients with advanced solid malignancies. *Br. J. Cancer* **102**, 1699–706 (2010).
199. Adams, V. R. & Leggas, M. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Ther.* **29**, 1338–53 (2007).
200. Da Silva, F., Thomas-Schoemann, A., Huillard, O., Goldwasser, F. & Blanchet, B. Benefit of therapeutic drug monitoring to disclose pharmacokinetic interaction between sunitinib and calcium channel blocker. *Ann. Oncol.* **27**, 1651–2 (2016).
201. van Leeuwen, R. W. F., van Gelder, T., Mathijssen, R. H. J. & Jansman, F. G. A. Drug interactions between tyrosine-kinase inhibitors and acid suppressive agents: more than meets the eye-Authors' reply. *Lancet. Oncol.* **15**, e470–1 (2014).
202. Foulon, V., Schöffski, P. & Wolter, P. Patient adherence to oral anticancer drugs: an emerging issue in modern oncology. *Acta Clin. Belg.* **66**, 85–96 (2011).
203. Noens, L. *et al.* Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. *Blood* **113**, 5401–5412 (2009).
204. Mazzeo, F. *et al.* Nonadherence to Imatinib Treatment in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors: The ADAGIO Study. *Anticancer Res.* **1410**, 1407–1409 (2011).
205. Huang, D. *et al.* Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **70**, 1063–71 (2010).
206. Welti, J. C. *et al.* Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib. *Oncogene* **30**, 1183–93 (2011).
207. Matsumoto, K. *et al.* Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res.* **23**, 4953–8 (2003).
208. Crawford, Y. *et al.* PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* **15**, 21–34 (2009).
209. Shojaei, F. *et al.* Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 911–20 (2007).
210. Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **111**, 1287–95 (2003).
211. Gao, H. & Deng, L. Sphingosine kinase-1 activation causes acquired resistance against Sunitinib in renal cell carcinoma cells. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 419–25 (2014).
212. Beuselinck, B. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms associated with outcome in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Br. J. Cancer* **108**, 887–900 (2013).
213. Garcia-Donas, J. *et al.* Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet. Oncol.* **12**, 1143–50 (2011).
214. Gotink, K. J. *et al.* Lysosomal sequestration of sunitinib: A novel mechanism of drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7337–7346 (2011).
215. Lankheet, N. A. G. *et al.* Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **110**, 2441–9 (2014).
216. Türk, D. & Szakács, G. Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 246–52 (2009).
217. George, S. *et al.* Hypertension as a potential biomarker of efficacy in patients with gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib. *Ann. Oncol.* **23**, 3180–7 (2012).
218. Donskov, F. *et al.* Sunitinib-associated hypertension and neutropenia as efficacy biomarkers in metastatic renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **113**, 1571–80 (2015).
219. Fujita, T. *et al.* Leukopenia as a biomarker of sunitinib outcome in advanced renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **34**, 3781–7 (2014).
220. Castellano, D., Ravaud, A., Schmidinger, M., De Velasco, G. & Vazquez, F. Therapy management with sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: key concepts and the impact of clinical biomarkers. *Cancer Treat. Rev.* **39**, 230–40 (2013).
221. Rautiola, J., Donskov, F., Peltola, K., Joensuu, H. & Bono, P. Sunitinib-induced hypertension, neutropenia and thrombocytopenia as predictors of good prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int.* **117**, 1–8 (2014).
222. Zurita, A. J., Jonasch, E., Wu, H.-K., Tran, H. T. & Heymach, J. V. Circulating biomarkers for vascular endothelial growth factor inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer* **115**, 2346–54 (2009).
223. Gruenewald, V. *et al.* Circulating endothelial cells are an early predictor in renal cell carcinoma for tumor response to sunitinib. *BMC Cancer* **10**, 695 (2010).
224. Murukesh, N., Dive, C. & Jayson, G. C. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br. J. Cancer* **102**, 8–18 (2010).
225. Harmon, C. S. *et al.* Circulating proteins as potential biomarkers of sunitinib and interferon- α efficacy in treatment-naïve patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**, 151–61 (2014).
226. Joosten, S. C. *et al.* Resistance to sunitinib in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive markers and

- future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1855**, 1–16 (2015).
227. Dubrowskaja, N. *et al.* Neurofilament Heavy polypeptide CpG island methylation associates with prognosis of renal cell carcinoma and prediction of antivasular endothelial growth factor therapy response. *Cancer Med.* **3**, 300–309 (2014).
 228. Gámez-Pozo, A. *et al.* MicroRNA expression profiling of peripheral blood samples predicts resistance to first-line sunitinib in advanced renal cell carcinoma patients. *Neoplasia* **14**, 1144–52 (2012).
 229. Prior, C. *et al.* Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e86263 (2014).
 230. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* **65**, 5–29
 231. Torre, L. A. *et al.* Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108 (2015).
 232. Haute Autorité de Santé. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hémato-poïétique: Cancers broncho-pulmonaires. Available at: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-10/guide_k_bronchopulmonaires_finalweb__091013.pdf. (Accessed: 1st January 2016)
 233. Hamra, G. B. *et al.* Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* **122**, 906–11 (2014).
 234. Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A. & Whetton, A. D. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 361–75 (2015).
 235. Reck, M. *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25 Suppl 3**, iii27-39 (2014).
 236. Travis, W. D. *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.* **10**, 1243–60 (2015).
 237. Enewold, L. & Thomas, A. Real-World Patterns of EGFR Testing and Treatment with Erlotinib for Non-Small Cell Lung Cancer in the United States. *PLoS One* **11**, e0156728 (2016).
 238. Facchinetti, F., Riseo, M., Di Maio, M., Graziano, P. & Novello, S. Tackling ALK in non-small cell lung cancer: the role of novel inhibitors. *Transl Lung Cancer Res* **5**, 301–321 (2016).
 239. Sun, J.-M., Ahn, M.-J., Choi, Y.-L., Ahn, J. S. & Park, K. Clinical implications of T790M mutation in patients with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* **82**, 294–8 (2013).
 240. Tsiambas, E. *et al.* EGFR gene deregulation mechanisms in lung adenocarcinoma: A molecular review. *Pathol. -- Res. Pract.* **212**, 672–677 (2016).
 241. Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2240–7 (2013).
 242. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, 75ra26 (2011).
 243. Nguyen, K.-S. H., Kobayashi, S. & Costa, D. B. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin. Lung Cancer* **10**, 281–9 (2009).
 244. Sharma, S. V. & Settleman, J. Oncogene addiction : setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *genes Dev.* **21**, 3214–3231 (2007).
 245. Janku, F., Stewart, D. J. & Kurzrock, R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 401–414 (2010).
 246. Mossé, Y. P., Wood, A. & Maris, J. M. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5609–14 (2009).
 247. Bergethon, K. *et al.* ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J. Clin. Oncol.* **30**, 863–870 (2012).
 248. Naidoo, J. & Drilon, A. KRAS-Mutant Lung Cancers in the Era of Targeted Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **893**, 155–78 (2016).
 249. Zago, G., Muller, M., Van Den Heuvel, M. & Baas, P. New targeted treatments for non-small-cell lung cancer- Role of nivolumab. *Biol. Targets Ther.* **10**, 103–117 (2016).
 250. Aupérin, A. *et al.* Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non - small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2181–2190 (2010).
 251. Institut National Du Cancer. Recommandations professionnelles Cancer du poumon non à petites cellules: Formes localisées non opérables , localement avancées et métastatiques. *Collect. Recommandations référentiels, INCa, Boulogne-Billancourt, Sept. 2010.*
 252. Lou, F. *et al.* Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **145**, 75–82 (2013).
 253. Schiller, J. H. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 92–8 (2002).
 254. Ardizzoni, A. *et al.* Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 847–57 (2007).
 255. Scagliotti, G. V. *et al.* Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3543–51 (2008).
 256. Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 947–57 (2009).
 257. Rosell, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **13**, 239–46 (2012).
 258. Sequist, L. V. *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3327–34 (2013).
 259. Wu, Y.-L. *et al.* Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **15**, 213–22 (2014).

260. Champiat, S., Ferte, C., Lebel-Binay, S., Eggermont, A. & Soria, J. C. Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncimmunology* **3**, e27817 (2014).
261. Zhang, Y., Huang, S., Gong, D., Qin, Y. & Shen, Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 389–395 (2010).
262. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–75 (2010).
263. Wang, C. *et al.* In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 846–56 (2014).
264. Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **372**, 320–30 (2015).
265. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced NonSquamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–35 (2015).
266. Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–39 (2015).
267. Hess, N. C. L. *et al.* Clinically meaningful blood pressure reductions with low intensity isometric handgrip exercise. A randomized trial. *Physiol. Res.* **65**, 461–468 (2016).
268. Hamanishi, J. *et al.* Efficacy and safety of anti-PD-1 antibody (Nivolumab: BMS-936558, ONO- 4538) in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol* **32**, 2014 (suppl, abstr 5511)
269. Antonia, S. J. *et al.* Phase I/II study of nivolumab with or without ipilimumab for treatment of recurrent small cell lung cancer (SCLC): CA209-032. *J Clin Oncol* **33**, 2015 (suppl, abstr 7503)
270. European Medicine Agency. Opdivo (Nivolumab) Assessment Report. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/003985/WC500197950.pdf. (Accessed: 19th September 2016)
271. M, H. *et al.* Safety and Efficacy of Nivolumab in an Ongoing Trial of a PD-L1+/- Patient Population with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. 2015
272. Scott N. Gettinger, Matthew David Hellmann, Frances A. Shepherd, Scott Joseph Antonia, Julie R. Brahmer, Laura Quan Man Chow, Jonathan Wade Goldman, Rosalyn A. Juergens, Hossein Borghaei, Neal Ready, David E. Gerber, Faith Ellen Nathan, Yun Shen, Christop, N. A. R. First-line monotherapy with nivolumab (NIVO; anti-programmed death-1 [PD-1]) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Safety, efficacy and correlation of outcomes with PD-1 ligand (PD-L1) expression. *J Clin Oncol* **33**, 2015 (suppl, abstr 8025)
273. Gettinger, S. N. *et al.* Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2004–2012 (2015).
274. Rizvi, N. A. *et al.* Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet. Oncol.* **16**, 257–65 (2015).
275. Rizvi, N., gettinger, S. & Goldman, J. W. Safety and efficacy of first-line nivolumab and ipilimumab in non-small cell lung cancer. in *world conference on lung cancer* abstract orla 02.05 (2015).
276. Brahmer, J., Reckamp, K., Baas, P., Crino, L. & Eberhardt, W. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 123–35 (2015).
277. Wolchok, J. D. *et al.* Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7412–20 (2009).
278. Postow, M. A. *et al.* Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2006–17 (2015).
279. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34 (2015).
280. Woo, S.-R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* **72**, 917–927 (2012).
281. Soliman, H., Mediavilla-Varela, M. & Antonia, S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? *Cancer J.* **16**, 354–359 (2010).
282. Hellmann, M. D., Friedman, C. F. & Wolchok, J. D. Combinatorial Cancer Immunotherapies. *Adv. Immunol.* **130**, 251–277 (2016).
283. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–61 (2015).
284. Sznol, M. & Chen, L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1021–1034 (2013).
285. Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A. & Smyth, M. J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* **75**, 2139–2145 (2015).
286. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
287. Carbognin, L. *et al.* Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): Sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PLoS One* **10**, e0130142 (2015).
288. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-.)*. **348**, 69–74 (2015).
289. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–21 (2013).
290. Rizvi, N. A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80-.)*. **348**, 124–8 (2015).
291. Lee, W. *et al.* The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* **465**, 473–7 (2010).

292. Govindan, R. *et al.* Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* **150**, 1121–34 (2012).
293. Kelderman, S., Schumacher, T. N. & Kvistborg, P. Mismatch Repair-Deficient Cancers Are Targets for Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Cell* **28**, 11–3 (2015).
294. Galon, J. *et al.* The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J. Transl. Med.* **10**, 1 (2012).
295. Mlecnik, B. *et al.* Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol.* **29**, 610–8 (2011).
296. Donnem, T. *et al.* Stromal CD8+ T-cell Density-A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2635–2643 (2015).
297. Remark, R. *et al.* The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 377–90 (2015).
298. Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 215–33 (2012).
299. Adotevi, O. *et al.* A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* **33**, 991–8 (2010).
300. Finke, J. H. *et al.* Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6674–6682 (2008).
301. Guislain, A. *et al.* Sunitinib pretreatment improves tumor-infiltrating lymphocyte expansion by reduction in intratumoral content of myeloid-derived suppressor cells in human renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 1241–1250 (2015).
302. Powles, T. *et al.* The effect of sunitinib on immune subsets in metastatic clear cell renal cancer. *Urol. Int.* **86**, 53–59 (2011).
303. Krusch, M. *et al.* The kinase inhibitors sunitinib and sorafenib differentially affect NK cell antitumor reactivity in vitro. *J. Immunol.* **183**, 8286–94 (2009).
304. Huang, H. *et al.* VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J.* **29**, 227–238 (2015).
305. Draghiciu, O., Nijman, H. W., Hooijboom, B. N., Meijerhof, T. & Daemen, T. Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *Oncimmunology* **4**, 1–11 (2015).
306. Noessner, E. *et al.* Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncimmunology* **1**, 1451–1453 (2012).
307. Voron, T. *et al.* VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* **212**, 139–148 (2015).
308. Tartour, E. *et al.* Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 83–95 (2011).
309. MacFarlane, A. W. *et al.* PD-1 Expression on Peripheral Blood Cells Increases with Stage in Renal Cell Carcinoma Patients and Is Rapidly Reduced after Surgical Tumor Resection. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 320–31 (2014).
310. Noé, G. *et al.* Clinical and kinomic analysis identifies peripheral blood mononuclear cells as a potential pharmacodynamic biomarker in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. (2016).
311. Iwamoto, N., Shimada, T., Terakado, H. & Hamada, A. Validated LC-MS/MS analysis of immune checkpoint inhibitor Nivolumab in human plasma using a Fab peptide-selective quantitation method: Nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis. *J. Chromatogr. B* **1023–1024**, 9–16 (2016).
312. Anderson, J. C. *et al.* Kinomic profiling of electromagnetic navigational bronchoscopy specimens: a new approach for personalized medicine. *PLoS One* **9**, e116388 (2014).
313. Puszkiel, A. *et al.* Evaluation of the interindividual variability in plasma nivolumab level in non-small-lung cancer outpatients: preliminary results. *Ann. Oncol.* **27**, 2016 (Suppl. abstr 1531P)
314. Huang, W.-C. & Hung, M.-C. Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J. Formos. Med. Assoc.* **108**, 180–94 (2009).
315. Yan, Z.-X. *et al.* MicroRNA181a Is Overexpressed in T-Cell Leukemia/Lymphoma and Related to Chemoresistance. *Biomed Res. Int.* **2015**, 197241 (2015).
316. Li, Y. *et al.* Persistent Antigen and Prolonged AKT-mTORC1 Activation Underlie Memory CD8 T Cell Impairment in the Absence of CD4 T Cells. *J. Immunol.* **195**, 1591–8 (2015).
317. Rincón, M. & Pedraza-Alva, G. JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **192**, 131–42 (2003).
318. Yang, D. D. *et al.* Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* **9**, 575–85 (1998).
319. Knutson, K. L. & Disis, M. L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 721–8 (2005).
320. Celada, L. J. *et al.* Programmed Death-1 Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signaling Impairs Sarcoidosis CD4+ T Cell Proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2016). doi:10.1165/rcmb.2016-0037OC
321. Li, Q. *et al.* A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity. *Immunity* **34**, 541–53 (2011).
322. Altomare, D. A. & Khaled, A. R. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr. Med. Chem.* **19**, 3748–62 (2012).
323. Punt, S. *et al.* Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncimmunology* **4**, e984539 (2015).
324. Wei, L., Wang, H., Yang, F., Ding, Q. & Zhao, J. Interleukin-17 potently increases non-small cell lung cancer growth. *Mol. Med. Rep.* **13**, 1673–80 (2016).
325. Punt, S. *et al.* The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review.

- Oncimmunology* **4**, e984547 (2015).
326. Chen, X. *et al.* Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* **69**, 348–54 (2010).
327. Simpson, K. D., Templeton, D. J. & Cross, J. V. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* **189**, 5533–40 (2012).
328. Johler, S. M., Fuchs, J., Seitz, G. & Armeanu-Ebinger, S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by cytotoxic drugs and is involved in immune escape and migration in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Immunol. Immunother.* (2016).
329. Otvos, B. *et al.* Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells* **34**, 2026–39 (2016).
330. Brennan-Bourdon, L. M. *et al.* MIF and TNF α serum levels in rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs: a cross-sectional study. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **37**, 207–13 (2015).
331. Motzer, R. J. *et al.* Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 722–31 (2013).
332. Kalra, S., Rini, B. I. & Jonasch, E. Alternate sunitinib schedules in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* **26**, 1300–4 (2015).
333. Bracarda, S. *et al.* Sunitinib administered on 2/1 schedule in patients with metastatic renal cell carcinoma: the RAINBOW analysis. *Ann. Oncol.* **26**, 2107–13 (2015).
334. Abdallah, A., Belal, M., El Bastawisy, A. & Gaafar, R. Plasma vascular endothelial growth factor 165 in advanced non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **7**, 2121–2129 (2014).
335. Voron, T., Tartour, É., Taieb, J. & Terme, M. [Impact of VEGF-A in exhaustion of intratumoral T cells]. *Médecine Sci.* **31**, 473–5 (2015).
336. Blanchet, B. *et al.* Development and validation of an HPLC-UV-visible method for sunitinib quantification in human plasma. *Clin. Chim. Acta* **404**, 134–139 (2009).
337. Corkum, C. P. *et al.* Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPTTM) and standard density gradient. *BMC Immunol.* **16**, 48 (2015).
338. Bioconductor. Available at: <https://www.bioconductor.org/>.

RESUME en français

L'identification de biomarqueurs prédisant la réponse au traitement est essentielle en cancérologie. La recherche de tels marqueurs doit être simple et peu invasive pour le patient. Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) constituent donc une matrice de choix. L'objectif de cette thèse a été l'évaluation des CMSP comme matrice biologique pour la recherche de biomarqueurs par approche kinomique chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique (CCRm) ou de cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC), traités respectivement par sunitinib ou nivolumab. Chez 21 patients atteints de CCRm, le sunitinib et son métabolite actif inhibaient *ex vivo* de façon variable la majorité des tyrosine kinases. Les profils kinomiques étaient associés au score pronostic de Heng et au ratio J21/J0 de lymphocytes totaux après début de traitement. Chez 28 patients atteints CBNPC, deux populations distinctes ont été identifiées, après 15 jours de traitement par nivolumab, en fonction du profil kinomique des Sérine/Thréonine kinases. Ces deux profils étaient associés au ratio lymphocytaire CD4/CD8 à J15, traduisant ainsi l'impact du nivolumab sur ces sous-types lymphocytaires. Ce travail a permis de valider l'utilisation de CMSP pour la future recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques par approche kinomique chez des patients traités par sunitinib ou nivolumab. **Mots clefs** : Kinomique, biomarqueurs, cancer, CMSP, sunitinib, nivolumab.

RESUME en anglais

Biomarker identification is essential in oncology to predict treatment response. The research of such markers should be simple and none invasive for the patient. Therefore, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could be a good biological matrix. The objective of this thesis was to evaluate PBMC as a biological matrix for biomarker research using a kinomic approach in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) or lung non-small cell cancer (NSCLC) patients, treated with sunitinib or nivolumab, respectively. In 21 mRCC patients, sunitinib and its active metabolite inhibited *ex vivo* most of tyrosine kinases with a large interindividual variability. Kinomic profiles were associated with Heng prognostic score and the D21/D0 total lymphocytes ratio after treatment start. In 28 NSCLC patients, two distinct populations were identified after 15 days of treatment with nivolumab, based on the kinomic profile of Serine / Threonine kinases. These two profiles were associated with CD4/CD8 lymphocyte ratio at D15, reflecting the nivolumab effect on lymphocyte subsets. This work suggests that PBMC can be used to seek future pharmacodynamic biomarkers, using a kinomic approach in patients under sunitinib or nivolumab therapy. **Key words** : kinomic, biomarker, cancer, PMBC, sunitinib, nivolumab.

