

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2021

N° 2021-226

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques

par

Nowenn LE LAN

Née le 03/02/1993 à Fontenay-aux-Roses (Hauts-de-Seine)

Présentée et soutenue publiquement le 20 octobre 2021

HLA-E/ β 2m - CD94/NKG2A : un nouveau point de contrôle immunitaire dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules ?

Président : Monsieur le Professeur Jean-François MOSNIER

Directeur de thèse : Madame le Professeur Céline BOSSARD

Membres du jury : Monsieur le Professeur Marc DENIS
Madame le Professeur Nadine GERVOIS
Madame le Docteur Christine SAGAN
Madame le Docteur Stéphanie BORDENAVE

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Céline BOSSARD,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail et je vous remercie également pour votre disponibilité, votre patience et votre bienveillance tout au long de ma thèse et de mon internat. Veuillez recevoir l'expression de ma plus grande reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-François MOSNIER,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Que ce travail soit l'occasion de vous exprimer mon plus profond respect et de vous remercier pour votre enseignement en pathologie et votre encadrement tout au long de mon internat.

A Monsieur le Professeur Marc DENIS,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de ma considération la plus sincère.

A Madame le Professeur Nadine GERVOIS,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assurée de ma considération la plus sincère.

A Madame le Docteur Christine SAGAN,

Je te remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Et surtout, je te remercie profondément pour ton investissement dans ma formation, la qualité de ton enseignement et pour tous tes encouragements tout au long de ce travail. Grâce à toi, mon premier compte-rendu restera à jamais un sublime LBA.

A Madame le Docteur Stéphanie BORDENAVE,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assurée de ma considération la plus sincère.

A tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de cette thèse :

A toute l'équipe de la Tumorothèque, Cécile, Sylvie, Noémie, Emilie, Cyrille, Emmanuel et Luc sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour et qui m'ont aidé tout au long de cette année dans la bonne humeur,

A Cécile Deleine, pour toutes les analyses d'immunohistochimie et à Anne Jarry pour son aide précieuse pour les études de cytométrie de flux,

A l'équipe de Micropicell, et particulièrement à Stéphanie Blandin, Annabelle Justin et Magalie Feyeux pour la numérisation des lames et leur aide pour maîtriser Qpath,

A toute l'équipe du service d'anatomopathologie du CHU de Nantes :

Aux Dr Loussouarn, Dr Lagrue (du service d'Anatomie Pathologie), Dr Galmiche-Rolland, Dr Eugène-Lamer, Dr Kandell-Aznar, Dr Toquet, Dr Denis-Musquer, Dr Joubert, Dr Cassagnau, Dr Renaudin et au Dr Ducornau pour leur enseignement en pathologie, leur accompagnement tout au long de mes semestres passés et tous leurs encouragements (même le weekend!),

Aux techniciens et aux secrétaires du service (Daniel, Sandra, Marie, Anthony, Oriane, Habib, Audrey, Fouad, Camille, Blandine, Olivia, Estelle, Justine, Julien, Gwendoline, Marie-Françoise, Alexandra, Julie, Catherine, et à Marie, Christine et Jacqueline), merci pour votre sympathie, votre bonne humeur, même en macro après la 1000ème pièce fraîche de la journée, pour les petits déjeuners et les soirées mémorables qu'on a passé ensemble !

A toute l'équipe du service d'anatomopathologie de La Roche sur Yon :

Aux techniciens et aux secrétaires (Karine, Melissa, Mélanie, Christian, Jessica, Emmanuel, Laura, Marianne, Sebastien, Samuel, Delphine, Elsa, Sylvianne, Mathilde, Sylvie et Aurélie), merci pour ce semestre rempli de bonne humeur, de petits déjeuners, de glaces volées à l'internat et de curages interminables ! Merci tout particulièrement aux Dr Leclair, Dr Moreau, Dr Liddle, Dr Dansette, Dr Bissainthe-Grellier et Dr Pavageau pour votre accompagnement, votre enseignement riche, votre gentillesse et votre bienveillance.

A tous ceux qui m'ont accompagnée tout au long de mon internat :

Aux équipes des services de pneumologie du CHU de Nantes et d'oncohématologie de La Roche sur Yon au sein desquelles j'ai passé deux semestres riches en patients, en rebondissements, en CV, en stéthoscopes, en myélogrammes et pose de drains gigantesques et qui m'ont apportée l'humilité nécessaire à tout bon pathologiste. Merci tout particulièrement aux Dr Dirou, Dr Hervé, Dr Cellerin, Dr Cavailles, Dr Villemagne, Dr Vigouroux, Dr Maisonneuve, Dr Cuvier, Dr Greilsamer et au Dr Bourcier pour leur accompagnement, leurs encouragements et leur patience pendant ces semestres au lit du patient, j'en garde un souvenir mémorable.

A l'ensemble des services d'anatomopathologie de L'ICO (Estèlle, Jonathan, Marie, Nadège et Solven) et de Saint-Nazaire et à l'équipe du service de Biologie Moléculaire Hématologique. Merci tout particulièrement aux Dr Gonin, Dr Lemarié, Dr Heymann, Dr Kerdraon, Dr Guerzider et Dr Bernard pour tout le temps que vous m'avez accordé, la qualité de votre enseignement et vos conseils précieux.

A mes cointernes, qui sont devenus au fil du temps des amis précieux,

Marion, ma première co-interne, tu as illuminé mon premier semestre (le bureau est bien vide et beaucoup moins drôle sans toi) ; à Cindy, pour ton soutien sans faille, ta bonne humeur et ta gentillesse à toutes épreuves et pour avoir été ma co-pigeon pendant toutes ces années ; à Oli, merci pour ta bonne humeur (notre petit rayon de soleil à tous, sauf le matin bien entendu), ta franchise mais surtout pour ta gentillesse ; à Raphaël, pour ton apprentissage du second degré avec une patience infinie et pour ma très courte carrière de trésorière, à Sarah, pour ton soutien, ta vivacité et ta candeur ; à Adeline, pour ton soutien et pour les petites douceurs de la dernière ligne droite et enfin à Julie, pour ta sélection de livres tout à fait appropriée, ton calme olympien en toutes circonstances et ta maîtrise du jeu de la grenouille.

A Mathilde B, pour ce semestre et tous les moments passés ensemble, de mon verger (tu vas pouvoir en avoir un grandeur nature maintenant) jusqu'au yoga sur la plage/marche/petite salade de petites graines ; à Clara, pour ton soutien et ta bienveillance lors de ce semestre hématologique qui aurait été infaisable sans toi ; à Baptiste, grand baron de la pneumologie et maître de la playlist éclectique, pour ta gentillesse et ta bonne humeur inébranlable et à Lise, pour avoir été d'abord ma camarade de drain/ponction et puis surtout pour après, pour tous nos dîners en amoureux et soirées endiablées sur la piste de danse.

Et enfin à tous ceux qui ont partagé ces longues années de médecine avec moi :

A ma famille,

A mes parents tout d'abord, merci pour tout votre soutien et vos sacrifices pendant toutes ces longues années, pour m'avoir accompagné aux quatre coins de l'Europe et pour m'avoir transmis toutes vos valeurs et votre goût de l'aventure (de la Suède en radeau jusqu'à la Roumanie en ânes en passant par la Croatie en bateau) et des destinations lointaines et farfelues. A ma sœur aussi, Anaëlle, pour toutes nos aventures ensemble passées et à venir, pour son aide, son soutien et sa sensibilité, j'admire ta ténacité qui n'a d'égale que ta gentillesse et ta bonté. Et bien sûr, à Oprah, le nouveau bébé de la famille.

A ma tante et mon oncle, Nadine et Stéphane, pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble à la « colonie » et pour m'avoir appris à monter tout en haut d'une échelle sans « trop » de cris, à ma tata et ma cousine, Brigitte et Sarah, pour toutes les vacances espagnoles passées ensemble de Ré jusqu'au Montgó, autour d'une paëlla (ou d'un bon céleri rave).

A mes grand-mères, Antoinette, pour ses délicieuses tartes et autres desserts, été comme hiver, ses calculs toujours très avantageux (sans aucun reste) et ses questions fétiches très célèbres (mais où est la plage la plus proche ?) et Francine, pour m'avoir appris à avoir la main verte, l'art de la couture, de la Bretagne et de la ratatouille.

A mes grand-pères, Jacques et Guy, pour avoir relu tous les bulletins de la grande saucisse et pour m'avoir emmenée à mes toutes premières leçons de voile par tous les temps, sur mon petit optimist, et à mon tonton Michel, pour sa bonne humeur contagieuse et pour son initiation à l'art du Jamón.

A mes amis,

A Margault, pour les moments passés ensemble, souvent autour d'une bonne Choucroute Melba et à Jérémy, roi de l'animation et de Center Park (je peux certifier bientôt ...),

A Olivia, Odile, Aline, Pauline, Cécile et Benoît, pour nos années folles (du collège, voire même de la maternelle...) au lycée,

A Mathilde L, pour toutes nos années de médecine passées ensemble, pour tous nos trajets dans le fameux RER B (qu'on pourrait renommer à nos noms vu le temps qu'on y a passé...) et pour le petit-déjeuner le plus matinal de toute ma vie au café les Deux Magots, qu'on pourrait refaire en cette fin d'année de thèse !

A la Team BU, pour toutes ces longues heures de sieste, de libanais, de café et surtout de rigolade, autour de notre table qui porte les marques de notre passage jusqu'à la fin des temps. A Julie, pour tous tes diapos vacances, ta bonne humeur et ton soutien infailible, à My-Anh, pour ton pragmatisme et ton calme dans toutes les situations (sauf bien sûr en cas d'absence de vivres...) et à Aurélien, pour ton caractère Normand et Corse bien trempé !

A Mathilde G, pour ta bonne humeur transmise sous la forme de chansons à partir de n'importe quel mot, de chorégraphies et autres poses « vivantes » dans n'importe quelle situations, à Alexis, pour ton analyse fine du monde, ton goût raffiné et tes multiples shampoings violets, à Santa, pour ta bonne humeur, ton tout petit grain de folie qui nous fait tant rire et tes talents de danseuse étoile (surtout à travers les fenêtres), à Romain, pour tes chemises uniques, ton calme olympien pendant les tempêtes corses et tes talents d'imitateur inégalés, à Raphaël, pour son flegme allemand mais que j'ai quand même grillé en haut de la montagne, à Camille, pour le trajet haut en couleurs dans la montagne albanaise, à Claire-Marie, pour ce semestre mémorable à Port-Royal, à Tatiana, et à Roxane et Robin, et maintenant Héloïse, dernière recrue en date de « kiffons la vie comme jamais ». Et surtout à la très grande Maria Poushkova, pour son obstination légendaire, probablement due à son caractère russo-celtique bien trempé.

A Claire, Andoni et Lily, pour cette année inoubliable en terre magyare et toutes les aventures qui en découlent, de Cluj-Napoca à l'île d'Yeu, toutes les parties de jeu enflammées, quoi qu'on fasse de toute façon, on finit toujours par se retrouver dans la même ville ! Et aussi à Mirjam et Dori, mes toutes premières (vraies) colocs, ma première maison loin de Paris, à Harminckettesek tere ! Et à La Réunion (Anna, Judith, Mathias, Karola, Wolfgang et Daschi), pour toutes nos réunions aux quatre coins de l'Europe, j'ai hâte de vous revoir (Egészségedre !) !

A Audrey, pour toutes ces années d'internat à la Roche, et à Nantes, tous les bons moments passés ensemble, et surtout toutes les bêtises qu'on a pu faire d'Audreylsan au retour en Uber de Laennec en passant par l'incident mythique des canapés (pour ne citer que celles-là) et surtout à toutes celles qu'on va encore continuer à faire, parce que c'est quand même vrai qu'on se marre bien !

A Benoît, maître incontestable du chill et de la chambre avec vue sur piscine, pour tous les thés/dîners et soirées passés ensemble, ton soutien et ta patience infinie envers ta machine à laver.

A Adeline, pour ton soutien, pour m'avoir fait découvrir le ski, l'UCPA et pour tous les expériences enneigées et autres à venir !

A Alex, grand chef de la villa des abuseurs, maître absolu de la kiffance en toutes circonstances, pour toutes les croziflettes qu'on a déjà mangé et celles qu'on va encore manger, pour tous les trajets en voiture dans mon cabriolet, pour m'avoir appris le mot levrette café (machin truc) et pour ton apprentissage inlassable, contre vents et marées du second degré (que j'ai peut-être finalement réussi à capter, qui sait !).

A Clara, pour ton soutien, ta bienveillance et tes talents de cuisinière polenta/œufs et fervente lectrice de BD et Cyrille, pour ton café et ta coriandre, à Naïla, pour ta joie de vivre et ton entrain contagieux (peut-être qu'un jour, on passera toute une soirée ensemble sans que tu ailles à la piscine/aéroport/...), à Bérénice, pour ta gentillesse sans égale, à Marie (bientôt au piano) et à Anne-Sophie (en toute simplicité).

A mes petits camarades d'internat : Omblin (reine des reines de Laennec, jamais choquée, jamais déçue), Tanguy (passé maître dans l'art de savoir tout faire, d'une bibliothèque à R), Alice, Astrid, Elise, Elliot, Adèle, Hassan, Fanny, Charlène et Charlotte, pour ce premier semestre riche soirées (du lundi soir au samedi soir inclus, souvent à la Ribouldingue d'ailleurs) ! Et puis à Erwan, Laure, Antoine, Jérôme, Noémie, Anne, Martin, Philo, Marie-Emeline, Quentin, Audry, Elise, Hugo, Amaury, Adrien, Erwan, Marie, Clarisse, Vincent Et Hugo pour ce deuxième premier semestre à Saint Naz, très festif, très gustatif mais surtout très sportif entre la piscine, les fléchettes et la course, jamais la vie à l'internat n'aura été « aussi » saine !

Merci à vous tous pour ces dix longues années et à bientôt pour toutes nos aventures à venir !

A mes grand-pères, Jacques et Guy,
Et à mon tonton Michel,

Sommaire

Liste des abréviations.....	10
Généralités	11
I. Les carcinomes pulmonaires non à petites cellules : état de la science.....	11
I.1 Données épidémiologiques	11
I.2 Oncogenèse et classification	13
I.3 Facteurs pronostiques	21
I.4 Traitements des CPNPC.....	23
II. Le microenvironnement tumoral immunitaire et l'immunothérapie dans les CPNPC	26
II.1 Les acteurs de l'immunité anti-tumorale.....	26
II.2 La réponse immunitaire anti tumorale dans les cancers pulmonaires	30
III. Nouvelle piste dans l'immunothérapie : le point de contrôle immunitaire HLA-E/ β 2microglobuline	36
III.1 Le ligand HLA-E- β 2m et rôle physiologique.....	36
III.2 Implication du point de contrôle HLA-E/ β 2m – CD94/NKG2A dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	38
III.3 Perspective de traitement : le Monalizumab et essais en cours	40
But de l'étude	42
Patients et méthodes.....	43
I. Patients	43
II. Critères d'inclusion et d'exclusion	43
III. Recueil des données cliniques	44
IV. Etude morphologique	45
V. Etude phénotypique.....	45
V.1 Sélection des zones d'intérêt.....	45
V.2 Technique immunohistochimique	45
V.3 Evaluation de l'expression des anticorps	46
VI. Détermination du statut EGFR	49
VII. Cytométrie en flux – analyse phénotypique des TIL.....	49
VIII. Analyses statistiques.....	51
IX. Ethique et financement	52
Résultats.....	53
I. Caractéristiques anatomo-cliniques des patients inclus dans la cohorte.....	53
II. Profil d'expression tissulaire des ligands HLA-E/ β 2m et PDL1	55
II.1 Profil d'expression du ligand HLA-E/ β 2m dans le tissu pulmonaire normal	55
II.2 Profil d'expression des ligands HLA-E/ β 2m et PDL1 dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules en fonction des caractéristiques anatomo-cliniques	56

III.	Caractérisation des cellules immunitaires dans les carcinomes non à petites cellules	59
III.1	<i>Densité des cellules immunitaires intra-épithéliales dans les CPNPC en immunohistochimie ...</i>	59
III.2	<i>Corrélation entre la densité en cellules immunitaires et les caractéristiques cliniques</i>	60
III.3	<i>Caractérisation des cellules immunitaires intratumorales en cytométrie en flux</i>	63
IV.	Influence pronostique des marqueurs de l'immunité anti-tumorale et de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m.....	67
IV.1	<i>Survie globale des patients inclus.....</i>	67
IV.2	<i>Survie en fonction de l'expression du ligand HLA-E/β2m et du PDL1</i>	68
IV.3	<i>Survie en fonction des marqueurs de l'immunité anti-tumorale.....</i>	72
	Discussion	73
	Perspectives.....	77
	Annexes.....	78
	Bibliographie.....	80

Liste des abréviations

ALK: anaplastic lymphoma kinase
β2m: beta 2 microglobuline
BPCO: Bronchite pulmonaire chronique obstructive
CCR: cancer colorectal
CIS: Carcinome in situ
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CPC : carcinome pulmonaire à petite cellule
CPNPC : carcinome pulmonaire non à petite cellule
ECM: extracellular matrix, matrice extra-cellulaire
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
HES: Hémalun Eosine Safran
HLA-E: Human Leukocyte Antigen-E
IHC: Immuno-Histo-Chimie
ILC: innate lymphoid cell, cellule lymphoïde innée
ITK: inhibiteur de tyrosine kinase
KIR: Killer-cell Immunoglobuline-like Receptor
LPS: Liposaccharide
NGS: Next Generation-Sequencing, séquençage nouvelle génération
NK cell: lymphocyte Natural Killer
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-L1: Programmed death-ligand 1
TAA: Tumor associated antigen, antigène associé au cancer
TAN: Tumor Associated Neutrophils, polynucléaires neutrophils intra-tumoraux
TCR: T cell receptor
TFH: T-follicular helper, lymphocyte T folliculaire helper
TIL(s): Tumor-Infiltrating Lymphocyte(s), lymphocyte(s) intra-tumoral(aux)
TILs-IEL: lymphocytes tumoraux intra-épithéliaux
TLS: Tertiary lymphoid structure, structure lymphoïde tertiaire
TNM: Tumor Node Metastasis
TSM: Taux Standardisé Monde
UICC: Union Internationale Contre le Cancer
WHO: World Health Organisation

Généralités

I. Les carcinomes pulmonaires non à petites cellules : état de la science

I.1 Données épidémiologiques

Malgré une meilleure compréhension de la carcinogénèse et des progrès thérapeutiques récents grâce aux immunothérapies, le cancer pulmonaire reste l'un des enjeux majeurs de santé publique de ces dernières décennies du fait du nombre de cas en constante augmentation et de la proportion élevée de décès qu'il entraîne. Depuis plusieurs années, les pays en voie de développement font face à une augmentation de l'incidence des néoplasies pulmonaires en lien avec la consommation de tabac (1).

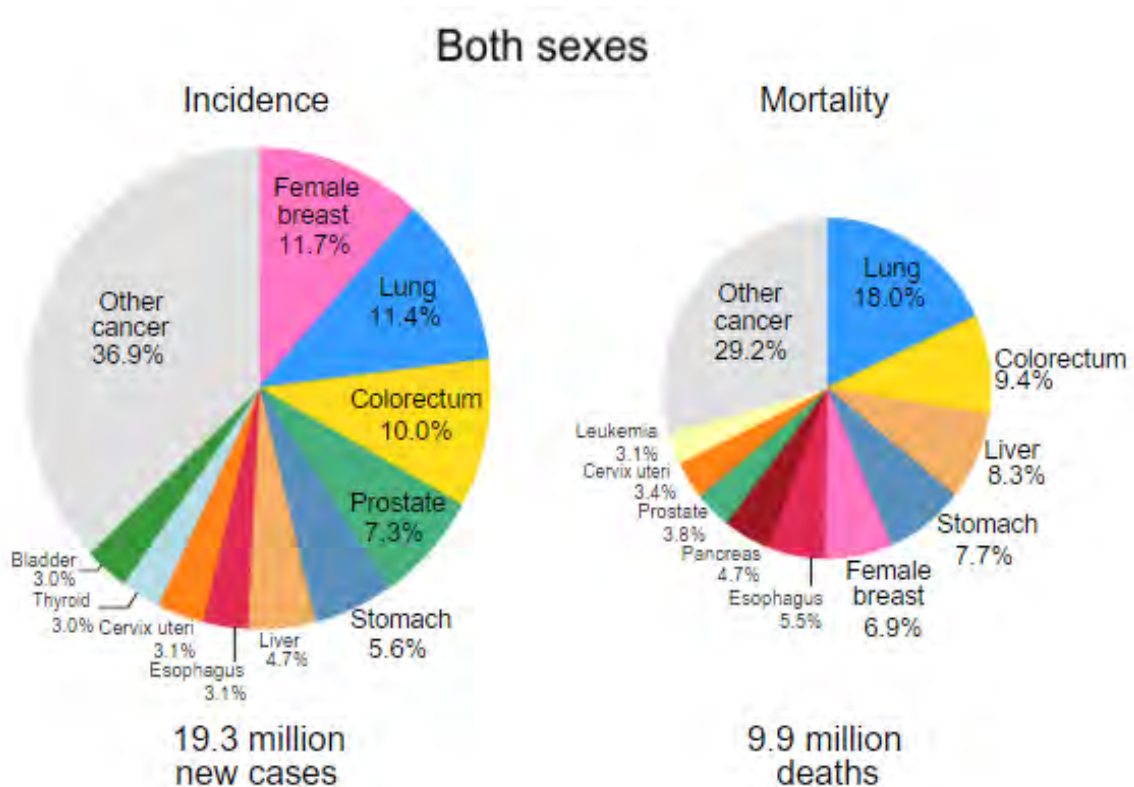


Figure 1: répartition de l'incidence et de la mortalité des 10 principaux cancers en 2020 (homme et femme). Issu de : GLOBOCAN 2020

En 2012, on dénombrait 1,8 millions de nouveaux cas et 1,6 millions de décès dans le monde selon GLOBOCAN (base de données en ligne sur les statistiques des cancers), contre une estimation autour de 2,09 millions de nouveaux cas et 1,76 millions de décès en 2020 (1).

Le principal facteur de risque de cancer pulmonaire est la consommation de tabac (2). Parmi les pays ayant réussi à réduire la consommation de tabac dans la population, d'autres facteurs de risque changent la démographie des nouveaux patients atteints de cancer du poumon. Ces facteurs

de risque sont nombreux et variés et incluent la pollution de l'air, la radioactivité naturelle (uranium, radon et radium), les expositions professionnelles (amiante), les prédispositions génétiques, les antécédents de maladie pulmonaire chronique, les infections, le régime, l'obésité et l'activité physique.

En France, le cancer du poumon est le deuxième cancer le plus fréquent chez les hommes et le troisième chez les femmes. Ainsi, avec une estimation de 33 117 décès en 2018, il représenterait la première cause de décès par cancer chez les hommes et la deuxième chez les femmes (précédé par le cancer du sein)(3).

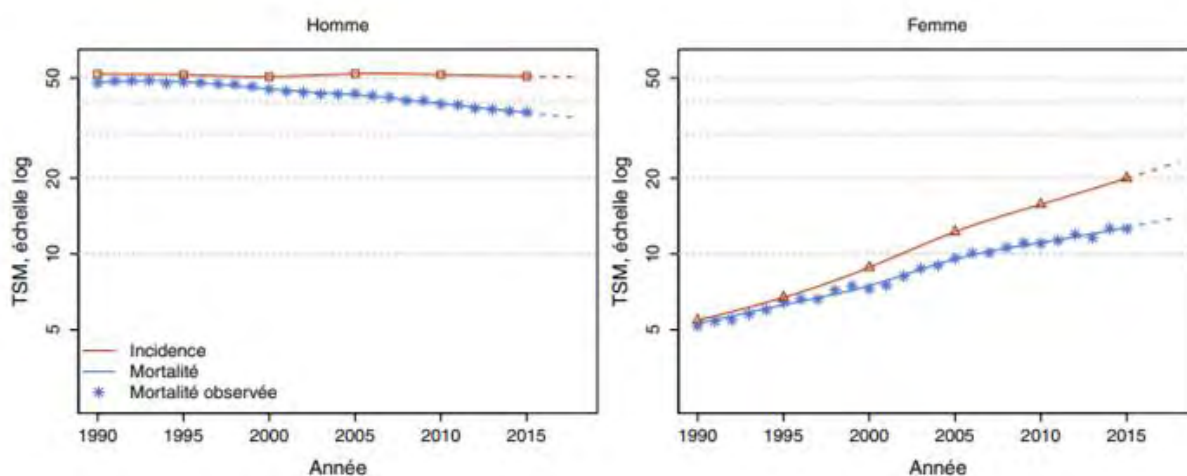


Figure 2: taux d'incidence et de mortalité du cancer du poumon en France selon l'année (taux standardisés monde TSM). Issu du rapport des estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018

L'âge médian au diagnostic en 2018 est de 67 ans pour les hommes et 65 ans pour les femmes. L'âge médian au décès est de 69 pour les hommes et 68 ans pour les femmes.

Récemment, des changements dans les habitudes de consommation du tabac ont modifié les dynamiques épidémiologiques du cancer du poumon : depuis 2005, on observe une légère diminution de l'incidence des cancers pulmonaires chez les hommes (-0.3% par an) tandis que l'incidence pour les femmes connaît une accélération non négligeable depuis 1990 (5.3% par an entre 1990 et 2018). Suivant le même schéma, la mortalité est en décroissance chez les hommes tandis que pour les femmes, on note la même accélération que celle notée pour l'incidence (3).

Ainsi, le cancer pulmonaire reste l'un des plus meurtriers et représente un fardeau significatif pour les systèmes de santé du monde entier.

1.2 Oncogenèse et classification

La classification actuelle des cancers pulmonaires est basée sur la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé révisée en 2021 (World Health Organisation (WHO) Thoracic Tumours, édition 2021). Elle permet de définir un type de tumeur selon une analyse morphologique et phénotypique. Les tumeurs épithéliales sont les plus fréquentes et sont majoritairement représentées par les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les tumeurs neuroendocrines. On peut également citer les carcinomes à grandes cellules et les carcinomes adéno-squameux.

Avant la classification OMS 2004 des cancers pulmonaires, la différenciation entre carcinome épidermoïde et adénocarcinome n'avait pas d'implication thérapeutique majeure. Ainsi, ces deux entités étaient regroupées sous le terme de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) pour les distinguer des carcinomes à petites cellules (CPC) appartenant au groupe des tumeurs neuroendocrines et dont la stratégie de traitement diffère radicalement. De nombreux travaux ciblant les différentes voies d'oncogénèse, dans les adénocarcinomes notamment, ont permis de mettre au point des thérapies ciblées révolutionnant la prise en charge thérapeutique basée jusqu'alors sur la chimiothérapie exclusive, et par conséquent d'améliorer significativement la survie des patients. Ainsi, la découverte des mutations du gène EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) a abouti à l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de première, puis de deuxième et de troisième génération. Il en va de même pour les réarrangements d'ALK (anaplastic lymphoma kinase) et de ROS1.

La mise en évidence de ces nouvelles cibles thérapeutiques au cours de la dernière décennie a pointé la nécessité de mettre au point une classification destinée spécifiquement aux « petits prélèvements » (biopsies et cytologie). La classification IASLC/ATS/ERS(4) des carcinomes non à petites cellules pallie ce besoin et permet une gestion raisonnée de ces « petits prélèvements » qui représentent souvent les seuls prélèvements de la lésion tumorale disponibles chez les patients présentant d'emblée une maladie métastatique. Elle utilise des termes réservés à ces types de prélèvements (carcinome pulmonaire non à petites cellules regroupant notamment les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes; et carcinome pulmonaire à petites cellules).

De nombreux progrès ont été réalisés mais la carcinogénèse des cancers pulmonaires reste complexe et met en jeu l'acquisition de mutations génétiques et de modifications épigénétiques qui dérèglent les étapes cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, l'invasion et les métastases. Récemment, grâce aux progrès des techniques de séquence de l'ADN en biologie moléculaire et tout particulièrement devant l'avènement de la technique par NGS (Next generation-sequencing ; séquençage nouvelle génération), plusieurs classifications se fondant sur des critères moléculaires et de mutations récurrentes ont été proposées (5).

Box 1 World Health Organization classification of lung cancer
Adenocarcinoma
Lepidic adenocarcinoma
Acinar adenocarcinoma
Papillary adenocarcinoma
Micropapillary adenocarcinoma
Solid adenocarcinoma
Invasive mucinous adenocarcinoma
Colloid adenocarcinoma
Fetal adenocarcinoma
Enteric adenocarcinoma
Minimally invasive adenocarcinoma
Squamous cell carcinoma
Neuroendocrine tumors
Carcinoid tumors
Typical carcinoid
Atypical carcinoid
Small cell carcinoma
Large cell neuroendocrine carcinoma
Large cell carcinoma
Adenosquamous carcinoma
Pleomorphic carcinoma
Spindle cell carcinoma
Giant cell carcinoma
Carcinosarcoma
Pulmonary blastoma
Other and unclassified carcinomas
Lymphoepithelioma-like carcinoma
NUT carcinoma
Salivary gland-type carcinomas
Mucoepidermoid carcinoma
Adenoid cystic carcinoma
Epithelial-myoepithelial carcinoma
Mesenchymal tumors, lymphohistiocytic tumors, tumors of ectopic origin, and metastatic tumors
<i>Adapted from Travis WD, Brambila E, Burke AP, et al. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th edition. Lyon (France): IARC Press; 2015.</i>

Figure 3: Classification OMS 2015 des cancers pulmonaires (ancienne classification). Issu de Zheng, 2016.

1.2.1 Adénocarcinome

L'adénocarcinome est le type tumoral le plus représenté dans les cancers pulmonaires : il représente 40 % des cancers pulmonaires, 60 % des carcinomes pulmonaires non à petites cellules et 70 % des pièces opératoires pulmonaires aux Etats-Unis (6).

L'hyperplasie adénomateuse atypique est souvent décrite comme une lésion précurseur de l'adénocarcinome pulmonaire : ce continuum est suggéré d'une part par des similarités morphologiques et d'autre part, par une concordance des événements génétiques associés (7) . En effet, les lésions d'hyperplasie adénomateuse atypique présentent des taux relativement élevés de mutations KRAS et EGFR (33 et 35%). Il s'agit morphologiquement d'une prolifération de pneumocytes de type II avec des atypies cellulaires modérées (8).

Dans ce continuum lésionnel, la cellule d'origine pourrait être le pneumocyte de type II ou de type I. Des mutations EGFR et KRAS seraient alors à l'origine de prolifération type hyperplasie atypique

adénomateuse puis adénocarcinome in situ puis l'adénocarcinome invasif. Toutefois, ce modèle reste controversé. (9)

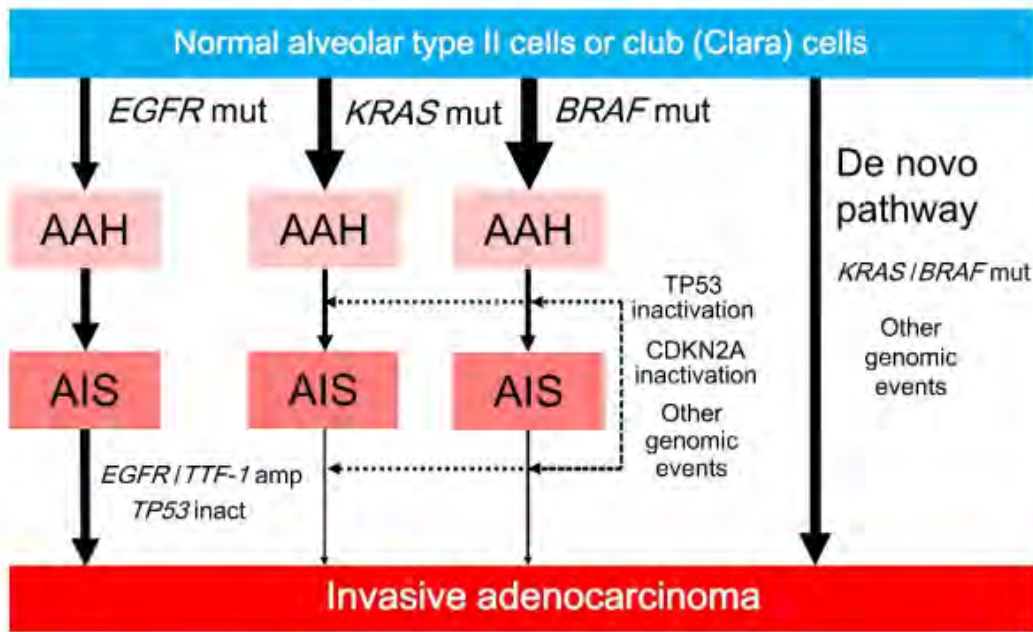
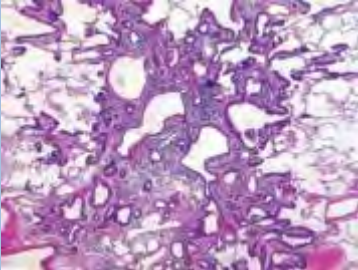


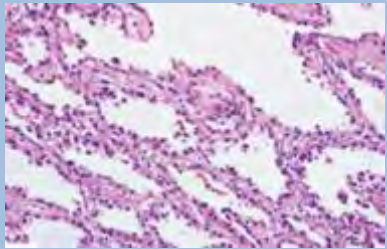
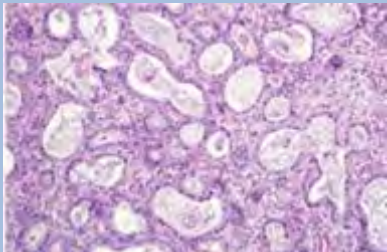
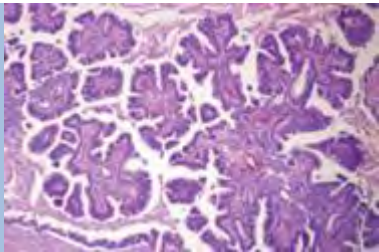
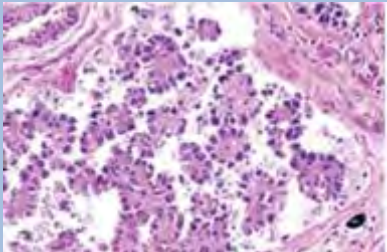
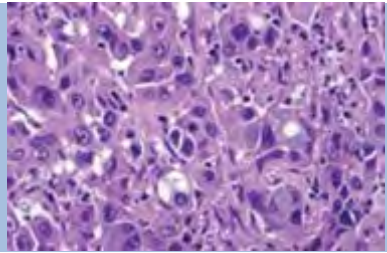
Figure 4: voies d'oncogénèse des adénocarcinomes pulmonaires. Issu de Inamura & al, 2018

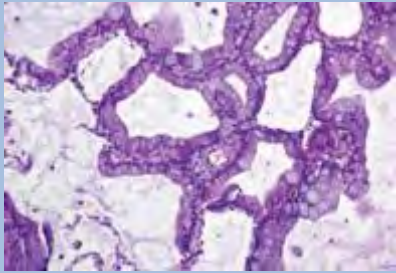
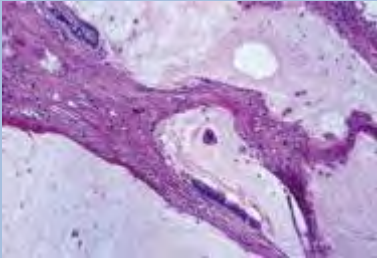

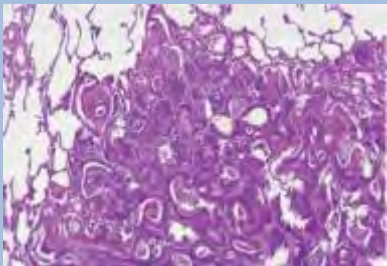
L'adénocarcinome in situ correspond à une prolifération de cellules tumorales d'architecture lépidique, c'est-à-dire respectant le parenchyme pulmonaire et se mouvant le long des alvéoles pulmonaires sans contingent infiltrant.

Les adénocarcinomes invasifs se décrivent selon leur architecture prédominante : chaque composante architecturale est quantifiée sous la forme d'un pourcentage avec un incrément de 5% et le sous type majoritaire permet de définir celui de la tumeur. La plupart des adénocarcinomes présentent une hétérogénéité tumorale architecturale nécessitant un échantillonnage exhaustif pour déterminer la composante prédominante et décrire éventuellement s'il existe des contingents de pronostic péjoratifs.

Tableau 1: Principaux sous-types histologiques et caractéristiques histologiques et moléculaires (4,10-12)

Sous-type	Caractéristiques principales	Illustrations
A invasion minimale (AIS)	<ul style="list-style-type: none"> - Architecture lépidique - Tumeur de petite taille (<3cm) et comportant un contingent invasif de moins de 5 mm (stroma desmoplasique ou architecture acineuse, papillaire et micropapillaire) - Absence de nécrose tumorale, d'extension lymphovasculaire ou d'invasion de la plèvre - <u>Pronostic</u> : survie de 100% à 	

	5ans	
Lépidique	<ul style="list-style-type: none"> - Alvéoles tapissées par les cellules tumorales avec conservation de l'architecture pulmonaire - Présence d'au moins 5 mm de stroma desmoplasique ou myofibroblastique, ou STAS (Spread through air spaces ; dissémination tumorale par voie endo-alvéolaire) ou embolies vasculaires ou invasion pleurale ou nécrose tumorale - Apparence en verre dépoli au scanner - <u>Pronostic</u> : meilleur que les autres sous-types invasifs 	
Acineux	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules tumorales sous forme de glandes, de tubes anastomotiques ou de structures cribriformes - Architecture plus complexe ou cribriforme (pronostic plus défavorable) - Diagnostic différentiel : ne pas confondre stroma desmoplasique dans ce sous-type et septa alvéolaire épaissi dans l'architecture lépidique - <u>Pronostic</u> : intermédiaire 	
Papillaire	<ul style="list-style-type: none"> - Papilles de taille et de formes variables - Cellules tumorales arrangées autour d'un axe fibro-vasculaire - Présence de morules ou de psammomes fréquents - <u>Pronostic</u> : intermédiaire 	
Micro-papillaire	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules tumorales formant des touffes sans axe fibro-vasculaire - Présence possible de corps de Psammome - <u>Pronostic</u> : plus défavorable que pour les autres sous-types. 	
Solide	<ul style="list-style-type: none"> - Plages solides sans autre architecture - Expression TTF-1 et NapsinA - Expression focale de la P40 et la P63 possible - <u>Pronostic</u> : défavorable 	

Mucineux invasif	<ul style="list-style-type: none"> - Architecture lésionnelle, parfois foci d'architecture acineuse, papillaire ou micro-papillaire. - Lésion mal délimitée, souvent multifocale - Marquage TTF1 et Napsin A positif dans moins de 30% des cas. - <u>Pronostic</u> : peu de métastases à distance ou de dissémination lymphatique 	
Colloïde	<ul style="list-style-type: none"> - Grandes plages de mucine extracellulaire remplissant et détruisant les espaces alvéolaires. - Peu de cellules tumorales avec atypies cytonucléaires modérées flottant dans les plages de mucine ou tapissant les septas fibreux. - Immunophénotype : CK7+, CK20+, CDX2+. Marquage TTF1+. - Scanner : nodules solitaires ou périphériques 	
Fetal	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur rare, touchant les femmes dans la 4^{ème} décennie - Glandes formées par des cellules au cytoplasme clair riche en glycoprotéines avec des vacuoles infra-nucléaires <ul style="list-style-type: none"> - Présence de morules <ul style="list-style-type: none"> - Cellules TTF1+ - Mutation de l'exon 3 de la caténine (marquage nucléaire) - Diagnostic différentiel : blastome pulmonaire 	
Intestinal	<ul style="list-style-type: none"> - Même aspects histologiques et immunohistochimiques que les adénocarcinomes d'origine colique. - Epithélium pseudostratifié avec cellules cylindriques aux noyaux hyperchromatiques et cytoplasmes basophiles - Immunophénotype : au moins un marqueur de différenciation entérique (CDX2, CK20 ou MUC2). - Pattern entérique concernant au moins 50% de la prolifération tumorale. 	

Plusieurs études se sont portées sur la recherche d'une concordance entre le sous-type histologique et le profil moléculaire, sans consensus pour le moment.

Tableau 2: Les sous-types architecturaux des adénocarcinomes pulmonaires selon le profil mutationnel (13–15)

Altérations génétiques Sous-type histologique	Réarrangement ALK	Réarrangement ROS1	EGFR	Braf	Kras	Nras	Autres
AIS					+++		
Lépidique	+		++		+		RBM10, TERT
Acineux	++ Cribriforme	++	++				
Papillaire	++		++		+		
Micro-papillaire	++		++		++		TP53, SETD2, MGA et SMARCA4
Solide	++ avec cellules en bague à chatons				+		TP53, SETD2, MGA et SMARCA4
Mucineux invasif	-		-		++		
Intestinal					+++ (>90%)		

1.2.2 Carcinome épidermoïde

Les carcinomes épidermoïdes sont le deuxième type tumoral le plus fréquent dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Le tabac est l'un des facteurs de risque majeur de ces lésions et il est responsable de modifications génétiques et épigénétiques impliqués dans la carcinogénèse du carcinome épidermoïde. Les lésions associées au carcinome épidermoïde pulmonaire sont bien décrites depuis plusieurs années et forment le continuum suivant : hyperplasie des cellules basales, métaplasie malpighienne, dysplasie (légère, intermédiaire et sévère) et enfin carcinome in situ. Ces lésions sont pré-invasives et restent réversibles si l'exposition aux facteurs favorisants s'interrompt.

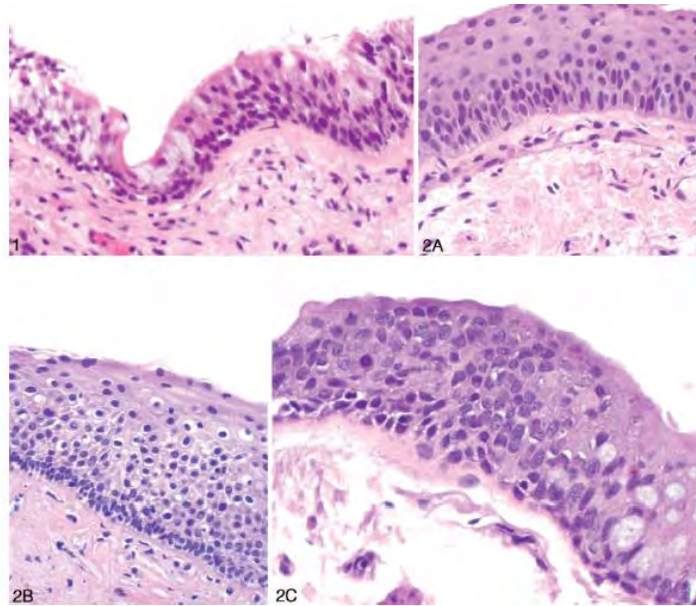


Figure 5: Biopsie transbronchique mettant en évidence une hyperplasie des cellules mucosécrétantes (en haut à gauche) et des cellules basales (en haut à droite) chez un patient avec un antécédent de carcinome épidermoïde pulmonaire. Métaplasie malpighienne avec légère dysplasie (en haut à droite) ; dysplasie modérée (en bas à gauche) et dysplasie sévère (en bas à droite). Coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran, grossissement x40. Issu de Dacic & al, 2008

L'hyperplasie des cellules basales se caractérise par la présence d'une couche de cellules ciliées et de trois ou plus couches de cellules basales sans cellules mucosécrétantes. La métaplasie malpighienne correspondant au remplacement de l'épithélium cilié bronchique par un épithélium malpighien non kératinisant (8). Il peut s'y associer de la dysplasie qui est alors gradée selon l'échelle suivante :

- Grade I : dysplasie légère : cellules de taille légèrement augmentées avec des atypies cytonucléaires restant légères à modérées et noyaux orientés verticalement. Présence de rares mitoses possibles.
- Grade II : dysplasie modérée : Atypies modérées avec mitoses ascensionnées jusqu'au tiers inférieur de la hauteur de l'épithélium.
- Grade III : dysplasie sévère : pléomorphisme nucléaire, tiers inférieur de l'épithélium densément cellulaire et mitoses confinées aux deux tiers inférieurs de l'épithélium.

L'hyperplasie des cellules basales et la métaplasie malpighienne sont des lésions courantes chez les patients tabagiques et ceux présentant une maladie chronique obstructive (BPCO). Leur fréquence augmente avec l'exposition au tabac. Il s'agit de lésions considérées comme physiologiquement normales en réaction à l'agression de l'épithélium par des agents exogènes (tabac, infections, ...) et par des processus inflammatoires. Mais la survenue de lésions de dysplasie associée est considérée comme l'entrée dans le processus de cancérisation (16).

Il s'agit d'un processus graduel mais qui peut également survenir de façon discontinue : il peut s'interrompre à tout âge, définitivement ou reprendre, voire régresser. Les transformations malignes observées sont plus souvent rapportées en rapport avec des lésions de dysplasie sévère. La

progression en lésion carcinomateuse peut durer de quelques mois à quelques années, d'où la stratégie de surveillance active mise en place chez les patients présentant ces lésions (17) .

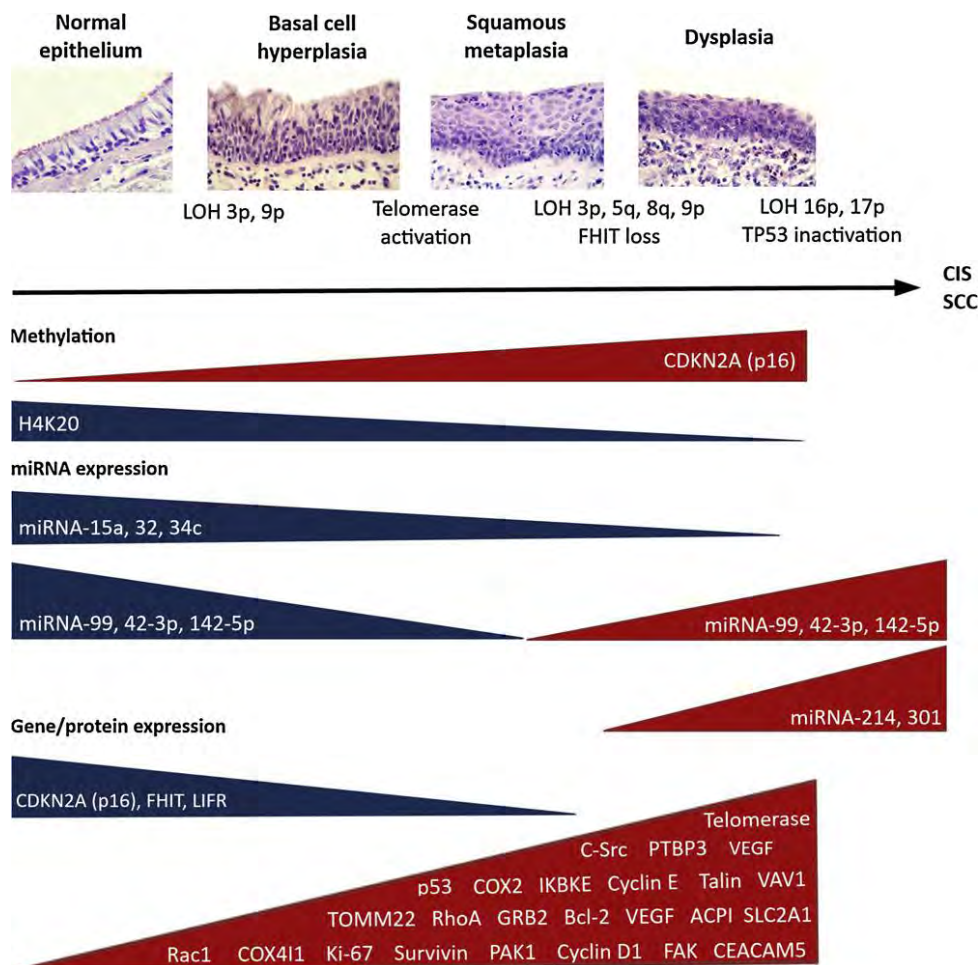


Figure 6: Altérations moléculaires en jeu dans les lésions précancéreuses des carcinomes épidermoïdes dans l'épithélium respiratoire. (LOH : perte d'hétérozygotie; CIS : carcinome in situ; SCC : carcinome épidermoïde). Issu de Denisov & al, 2019.

D'un point de vue moléculaire, la perte d'hétérozygotie des chromosomes 3, 5, 8 et 9 et l'inactivation des télomérases jouent un rôle majeur. La trisomie 7 peut activer la progression de l'hyperplasie basale vers le carcinome épidermoïde et est causée par l'exposition au tabac et l'exposition à l'uranium. La progression du carcinome in situ vers le carcinome invasif peut être liée à une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3p. La progression du carcinome in situ (CIS) est fortement dépendante de l'instabilité chromosomique. Les lésions de CIS ont des mutations fréquentes des gènes TP53, CDKN2A, SOX2 et AKT2. Des mutations activatrices d'EGFR et de KRAS ont aussi été décrites comme participant à la transformation maligne du CIS. (16)

La méthylation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et des gènes supresseurs de tumeur joue un rôle important dans les processus précancéreux de l'épithélium bronchique. On peut citer notamment la méthylation de CDKN2A, associée au tabac et la méthylation des histones. (16)

La classification des carcinomes épidermoïdes pulmonaires se base désormais uniquement sur la présence ou non de signes de kératinisation. Les carcinomes épidermoïdes kératinisants

présentent des globes cornés et/ou des ponts intercellulaires. Les carcinomes épidermoïdes non kératinisants sont donc moins bien différenciés et il faut parfois recourir à l'étude immunohistochimique pour réaliser un diagnostic précis. La positivité des marqueurs épidermoïdes (CK5/6, p40 et p63) et la négativité du TTF1 confirme le diagnostic. Il existe un seul sous-type histologique à différencier : le carcinome épidermoïde basaloïde. (10)

1.3 Facteurs pronostiques

1.3.1 Stade pTNM

Plusieurs facteurs pronostiques ont été mis en évidence par des méta-analyses de la littérature. Il s'agit tout d'abord du stade, qui est un élément reproductible et fiable, d'autant plus s'il est déterminé sur pièce opératoire. La taille tumorale compte également comme un facteur pronostique majeur chez les patients opérés de stade I. Le stade détermine la stratégie thérapeutique en intégrant certains critères cliniques comme l'indice de performance (PS) et l'opérabilité du patient. (18–20)

Pour les patients bénéficiant d'une résection chirurgicale, un stade pTNM (pathological Tumor Node Metastasis) est établi selon les recommandations de la 8^{ème} édition publiée par l'UICC (Union Internationale contre le Cancer) en 2017 (21) :

- Le stade pT correspond à l'extension locale de la lésion tumorale en fonction de sa taille et des structures adjacentes qu'elle envahit (bronche souche, plèvre viscérale, paroi thoracique, diaphragme, nerf phrénique, plèvre médiastinale, péricarde pariétale, ...).
- Le stade pN correspond à l'extension ganglionnaire loco-régionale.
- Le stade pM correspond à l'envahissement métastatique d'organes à distance. On notera que des nodules tumoraux séparés dans un lobe controlatéral, des nodules pleuraux tumoraux, une pleurésie tumorale ou bien une péricardite tumorale sont considérés comme un envahissement métastatique à distance.

Cette classification permet ensuite de déterminer le stade de la lésion (Cf annexe 1 et 2).

1.3.2 Facteurs cliniques et biologiques

Outre le stade, des facteurs cliniques présentent un impact majeur sur la survie. Il s'agit tout d'abord de l'indice de performance (PS), ainsi que l'âge et les antécédents tabagiques du patient. Le PS évalue l'état du patient à réaliser des activités quotidiennes selon plusieurs échelles (celle de Karnofsky, du « Eastern Cooperative Oncology Group » (ECOG) et de la « World Health Organisation » (WHO)). Il est particulièrement déterminant dans les stades avancés (stades > IIB), de même que l'âge. Le sexe est également un facteur pronostique notable, bien qu'il reste controversé dans la littérature. Enfin, le tabac correspond à un facteur de mauvais pronostic

indépendant, même pour les patients ayant bénéficié d'une résection chirurgicale carcinologique. (18,22,23)

1.3.3 Sous-types histologiques

Les facteurs histologiques s'appliquent essentiellement aux patients ayant bénéficié d'une chirurgie de résection, puisque certains d'entre eux ne peuvent être déterminés que sur pièce opératoire. Il s'agit tout d'abord du type histologique. La classification OMS des adénocarcinomes basée sur la classification IASLC/ATS/ERS identifie des sous-types histologiques présentant un impact pronostique majeur et plusieurs études ultérieures ont confirmé l'impact de ces sous-types histologiques. (12,24)

Pour les carcinomes épidermoïdes, seul type histologique qu'il convient de différencier est le carcinome épidermoïde basaloïde en raison de son pronostic péjoratif. (25)

Dans les études regroupant les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes, le grade de différenciation est un facteur histologique indépendant : dans une série californienne, la survie à cinq ans des patients de stade IA avec une tumeur bien différenciée est de 71% contre 53% si la tumeur est peu différenciée. (26,27)

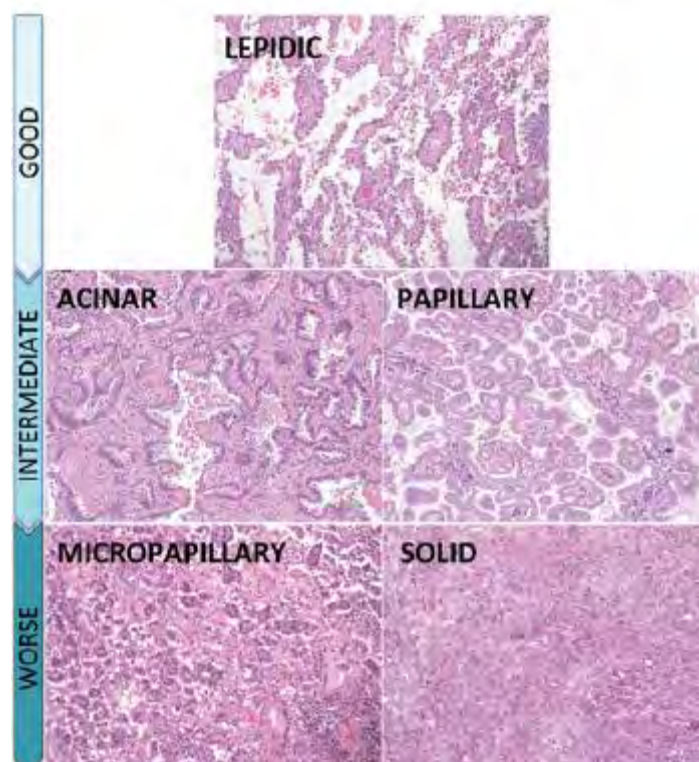


Figure 7: Impact pronostique des différents sous-types histologiques. Issu de Kuhn & al, 2018

L'infiltration de la plèvre viscérale représente un facteur de mauvais pronostic majeur : elle est maintenant intégrée dans la classification TNM. Une atteinte de la plèvre viscérale classe d'office la tumeur en stade pT2 quelle que soit sa taille et en stade pT3 pour la plèvre pariétale. D'autre part, l'atteinte pleurale caractérisée par un épanchement pleural avec présence de cellules néoplasiques correspond d'emblée à un stade métastatique M1a, et n'est ainsi plus accessible à un traitement

chirurgical. L'invasion vasculaire et les embolies lymphatiques ont également une valeur pronostique péjorative. (28)

D'autres facteurs sont également à prendre en compte tels que des anomalies biologiques (syndrome inflammatoire, hypercalcémie, ...).(19)

L'identification de ces facteurs pronostiques peut permettre de proposer au patient des traitements adjuvants si la lésion est accessible à une chirurgie ou bien d'intensifier le traitement systémique initial.

I.4 Traitements des CPNPC

Les propositions de traitement pour les patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules se basent avant tout sur le stade de la maladie néoplasique, l'opérabilité du patient (capacité ventilatoire, VEMS, antécédents ...) et sur le PS. Ces critères sont établis au cours du bilan pré-thérapeutique.

Schématiquement, il existe deux approches thérapeutiques différentes (29,30):

- Stade I, II, et IIIA avec un PS inférieur ou égal à 1 : chirurgie carcinologique parfois associée à une chimiothérapie néoadjuvante.
- Stade IIIB, IV et patients ne pouvant pas bénéficier d'une résection chirurgicale : traitement systémique.

I.4.1 Maladie résécable

Il s'agit des patients présentant un stade clinique I et II au bilan thérapeutique et opérables. Le traitement de référence est une chirurgie d'exérèse complète comportant un curage ganglionnaire complet. La lobectomie est le standard chirurgical et une chirurgie vidéo-assistée est utilisée pour les stades précoces.

Cet acte chirurgical est complété pour les patients classés pT2 et pT3 par une chimiothérapie néoadjuvante par Cisplatine/Pretextemed quand l'état général du patient le permet.

Pour les patients présentant des stades plus évolués, notamment IIIA, B ou C, deux attitudes sont discutées en Réunion de concertation Pluridisciplinaire.

- d'une part, une chirurgie d'exérèse avec curage médiastinal complet précédée de 2 à 4 cycles de chimiothérapie à base de Cisplatine si l'état général du patient le permet.
- ou bien, une chirurgie première accompagnée d'une chimiothérapie adjuvante.

Les patients présentant un stade clinique T4 ne sont pas systématiquement exclus d'un traitement local et une chirurgie peut se discuter en réunion de concertation pluridisciplinaire.

I.4.2 Révolution dans les traitements systémiques

Dans le cadre d'une maladie d'emblée métastatique ou bien en cas de récurrence, la stratégie thérapeutique s'axe alors sur des traitements systémiques dont le choix s'opère en fonction des résultats des recherches d'altérations moléculaires. Ainsi, pour ces patients non accessibles à un geste chirurgical, le seul matériel tumoral disponible est celui ayant permis le diagnostic et il s'agit le plus souvent de prélèvements de petite taille (biopsies sous fibroscopie, ou sous scanner), voire de prélèvements cytologiques uniquement (épanchement pleural avec cellules néoplasiques). Un bilan minimal théranostique est préconisé et il convient ainsi de préserver le matériel tumoral pour ces analyses en limitant au strict minimum les analyses immunohistochimiques complémentaires utiles pour le diagnostic. Cette stratégie est détaillée dans la classification IASCL/ATS/ERS. (11)

Pour les marqueurs théranostiques, le bilan comprend :

- Pour les adénocarcinomes :
 - le statut PD-L1 (Programmed death-ligand 1) : évalué par le score de cellules tumorales positives (TPS, Tumor Proportion Score). (31)
 - la recherche de la translocation ALK en immunohistochimie, confirmée si besoin par une étude en immunofluorescence in situ selon les recommandations AFAQAP 2017 et européennes.(32,33)
 - La recherche de la translocation ROS1 en immunohistochimie, confirmée en immunofluorescence in situ. (33)
 - Le statut moléculaire réalisé sur des plateformes de biologie moléculaire : il comprend la recherche de mutations des gènes EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), et en complément peut aussi comprendre la recherche de mutations BRAF, cMET (exon 14) et HER2 en technique NGS. (34,35)
- Pour les carcinomes épidermoïdes :
 - Le statut PD-L1 (utilisant le score TPS comme pour les lésions adénocarcinomeuses).(31)
 - Le statut EGFR si le patient est jeune et non-fumeur (consommation de moins de 10 paquets-années). (36)

Avant une deuxième ligne, le profil moléculaire de la tumeur peut être complété, notamment par une recherche de mutation du gène BRAF, la recherche de la mutation de l'exon 14 de MET et la recherche des fusions de RET et NTRK.

Selon ces résultats, un traitement systémique est alors proposé au patient. On peut noter que le statut moléculaire peut être déterminé sur ADN tumoral circulant en cas d'insuffisance de matériel tumoral si un nouveau prélèvement ne peut être réalisé.

I.4.2.1 Thérapies ciblées

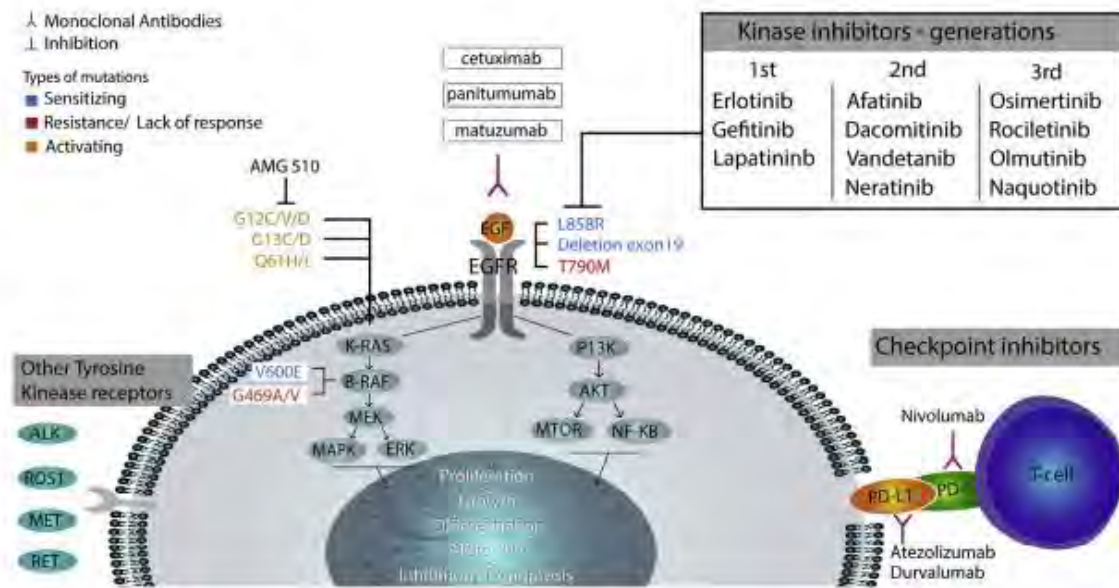


Figure 8: les principales thérapies ciblées et leur association avec les différentes voies de signalisation. Issu de Ruiz-Cordero & al, 2020

I.4.2.1.1 Ciblant l'EGFR

Le récepteur EGFR appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase ERBB et il est codé par le gène EGFR situé sur le chromosome 7 (7p11.2). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine-kinase.

Les mutations du gène EGFR dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules concernent majoritairement les adénocarcinomes bien que certaines études aient rapportées des cas de carcinomes épidermoïdes EGFR mutés. Elles concernent le plus souvent les populations asiatiques, ainsi que les femmes et les patients non tabagiques (37). Les mutations les plus fréquentes (80-90%) sont la délétion de l'exon 19 et la mutation p.L858R au niveau de l'exon 21.

Elles sont accessibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR de première (erlotinib, gefitinib), deuxième (afatinib) et troisième génération (osimertinib).

I.4.2.1.2 Ciblant le réarrangement ALK

ALK (Anaplastic lymphoma kinase) appartient à la famille des tyrosines kinases du récepteur à l'insuline et est codé par un gène situé sur le chromosome 2 (2p23). Les réarrangements d'ALK ont d'abord été mis en évidence dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules. Dans les carcinomes pulmonaires, la translocation d'ALK concerne environ 5% des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Il s'agit le plus souvent de patients jeunes, sans antécédent tabagique ou faiblement tabagiques (intoxication < ou = à 15PA) présentant un adénocarcinome non muté EGF-R ou KRAS et des stades cliniques avancés. (38)

Les traitements de référence sont alors les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK avec en première l'Alectinib et le Brigatinib.

I.4.2.1.3 Ciblant le réarrangement ROS1

L'oncogène ROS-1 a été décrit comme une cible potentielle dans les cancers pulmonaires. Il s'agit d'un récepteur de tyrosine-kinase de la famille des récepteurs d'insuline. Le réarrangement du gène ROS1 concerne environ 1 % des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Il s'agit de patients présentant le même profil que dans les réarrangements d'ALK. Il est accessible à un traitement ciblé de type inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) par Crizotinib.

I.4.2.2 Immunothérapie

L'immunothérapie a pour but principal de restaurer ou amplifier une réponse immunitaire adaptative ou innée au sein de la tumeur. Dans les cancers pulmonaires, le développement des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) représente une avancée significative et a permis de développer plusieurs traitements efficaces. (39,40) Il s'agit d'anticorps dirigés contre l'axe PD-1/PD-L1 ou le CTLA-4 rétablissant l'immunité anti-tumorale.

Ces ICIs font maintenant partie intégrante de l'arsenal thérapeutique pour les CPNPC et ont montré une amélioration de la survie au prix d'une toxicité limitée par rapport aux chimiothérapies traditionnelles (essais CheckMate 9LA, KEYNOTE-024 et 042). (41,42)

I.4.2.3 Chimiothérapie classique

Le traitement de référence des carcinomes pulmonaires non à petites cellules métastatiques est longtemps resté une chimiothérapie à base de sels de platine (carboplatine ou cisplatine) qui permet d'apporter un bénéfice non négligeable en termes de qualité de vie mais aussi en termes de survie. (30) Ces molécules sont prescrites en combinaison avec d'autres cytotoxiques comme le Pemetrexed (anti-métabolites), le Paclitaxel, le Docetaxel (taxanes) et enfin la Gemcitabine (anti-métabolite).

II. Le microenvironnement tumoral immunitaire et l'immunothérapie dans les CPNPC

II.1 Les acteurs de l'immunité anti-tumorale

II.1.1 Implication des acteurs de l'immunité innée dans la réponse anti-tumorale

L'immunité innée correspond à la première ligne de défense de l'organisme contre les agents reconnus comme du « non-soi » qu'ils soient endogènes (comme les processus tumoraux) ou bien

exogènes (comme les micro-organismes infectieux). Plusieurs types cellulaires participent à cette réponse immunitaire (43) :

- **Les cellules dendritiques** : elles sont issues de précurseurs myéloïdes communs avec les granulocytes et les macrophages et vont se différencier sous l'influence de facteurs de croissance (GM-CSF). Immatures, ces cellules sont capables de phagocyter des antigènes et migrer vers les organes lymphoïdes où elles mûrissent secondairement. Mais elles sont aussi présentes dans les organes lymphoïdes dits « tertiaires » retrouvés dans divers organes, ainsi que dans les proliférations tumorales et notamment dans les CPNPC (44). Ces cellules expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I et II) et des molécules de co-stimulation utilisées notamment pour l'activation des lymphocytes T. Elles ont trois rôles principaux : d'une part, la présentation antigénique participant à la réponse immunitaire adaptative (Cf ci-dessous). Elles sont également responsables de la sélection négative de lymphocyte T permettant ainsi la tolérance immunitaire du « soi ». Et enfin, elles produisent la sécrétion de chimiocytokines et cytokines entraînant la différenciation des lymphocytes T.
- **Les macrophages** : ces cellules monocytaires quittent la circulation sanguine pour s'établir dans les tissus. Il existe une certaine hétérogénéité des populations macrophagiques selon le tissu dans lequel elles s'établissent. Elle se traduit par des modifications dans leur morphologie, les pathogènes qu'elles peuvent reconnaître et le taux de cytokines inflammatoires qu'elles peuvent produire (c'est-à-dire IL-1, IL-6 et TNF α). Une classification des macrophages M1/M2 a été proposée sur le même modèle de polarisation lymphocytaire Th1/Th2. : les macrophages M1, activés par la voie classique (cytokines type 1), sont impliqués dans l'élimination et le contrôle des cellules tumorales et les macrophages M2, activés par des voies alternatives ont un rôle favorisant l'échappement à l'immunité anti-tumorale (45). Ainsi, certains macrophages empêchent la pénétration des lymphocytes TCD8⁺ cytotoxiques dans les tumeurs, réduisant ainsi leur activité anti-tumorale. (46)
- **Les cellules NK (natural killer)** : elles dérivent des précurseurs lymphoïdes médullaires et ne présentent pas de récepteur TCR (T cell receptor). Toutefois, ces cellules reconnaissent leur cellule-cible via des récepteurs à leur surface (activateurs et inhibiteurs, dont le récepteur KIR (Killer-cell Immunoglobuline-like Receptors), qui activé, suffit à lui seul pour inhiber la dégranulation des lymphocytes NK. Elles présentent une fonction cytolytique tantôt par action directe (sécrétion de granules lytiques) tantôt par action indirecte (anticorps avec activité cytotoxique ADCC, sécrétion d'IFN- γ (interféron) ou d'autres cytokines). Elles expriment les marqueurs CD56, NKP46 et CD16 à leur surface. Le CD 56 est une glycoprotéine de surface jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Elle est exprimée à la surface des lymphocytes NK mais également dans une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.(47) Le CD 16 est un récepteur de la partie constante Fc des immunoglobulines de type G (IgG) et est présent à la surface de nombreuses cellules de l'immunité innée, dont les lymphocytes NK. Enfin, le NKp46 (Natural Cytotoxicity triggering receptor 1) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules NK (48). Les principales fonctions des lymphocytes NK sont le contrôle des infections (notamment virales) et l'immuno-surveillance des lésions tumorales. Leur activation est une balance entre des signaux activateurs

et inhibiteurs et elles sont capables d'initier des réponses anti-tumorales sans sensibilisation préalable contrairement aux lymphocytes T « classiques ». Néanmoins, leur champ d'action au sein des tumeurs peut être réduit notamment par de nombreux signaux inhibiteurs provenant du microenvironnement tumoral, l'insuffisance de nutriments et d'oxygène et la concentration élevée en métabolites tumoraux (tels que le lactate).(49)

- **Les polynucléaires neutrophiles** : il s'agit des cellules de l'immunité innée initiant quasi immédiatement la réponse immunitaire dans les lésions tissulaires aiguës et dans les infections. Leur rôle dans le microenvironnement immunitaire tumoral fait l'objet de nombreuses études et semble variable. Plusieurs fonctions leur ont été attribuées et ainsi plusieurs phénotypes ont été individualisés : les phénotypes N1 et N2 et les cellules PMN-MDSCs (polymorphonuclear neutrophil myeloid-derived suppressor cells). Ces cellules correspondent à des TAN (tumor-associated neutrophils). Les cellules N1 ont des fonctions pro-inflammatoires et anti-tumorales et les cellules N2 ont des fonctions pro-tumorales. Enfin, les cellules PMN-MDSCs correspondent à des cellules myéloïdes immatures et ont été détectées dans plusieurs types de tumeurs. Il s'agit d'une population hétérogène présentant des propriétés immunosuppressives. (50)
- **Cellules lymphoïdes innées (ILCs)** : il s'agit d'une catégorie récemment décrite dans les cellules de l'immunité innée. Elles sont divisées en cinq catégories : les cellules NK (Cf ci-dessus), ILC1, ILC2, ILC3 et LTi (lymphoid tissue inducer cells). Les cellules ILC1 sont le pendant inné des lymphocytes T CD4+ Th1 et produisent de l'IFN γ et activent les macrophages. Les cellules ILC2 sont impliquées dans la réponse innée aux parasites tels que les helminthes. Elles ont la même signature cytokinique que les lymphocytes T CD4+ Th2. Enfin, les cellules ILC3 sont impliquées dans la réponse immunitaire innée contre les bactéries extracellulaires et les germes fongiques grâce à la production d'interleukine 17 et 22 (IL-17 et IL-22).(51,52). Ces cellules semblent être impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale mais leur rôle exact est en cours d'investigations. (52)

II.1.2 Implication des acteurs de l'immunité adaptative dans la réponse anti-tumorale

Les lymphocytes T sont au cœur de l'immunité adaptative anti-tumorale. Le développement des lymphocytes T a lieu dans un premier temps dans le thymus. Les cellules T progénitrices (dits thymocytes) entrent dans une phase de sélection avant de rejoindre la circulation lymphoïde. Tout d'abord, ils subissent des processus de réarrangements des gènes du récepteur des cellules T (TCR). L'expression d'un complexe TCR fonctionnel permet aux lymphocytes d'être sélectionnés une première fois sur leur capacité à reconnaître le complexe d'histocompatibilité (CMH) du soi. Une fois cette étape passée, les cellules T réagissant trop fortement avec le CMH du soi sont éliminés. Ils subissent alors ensuite une étape de maturation avec expression du CD4 ou du CD8 (lymphocytes T $\alpha\beta$).

Ces lymphocytes matures, mais naïfs (car n'ayant jamais été en contact avec des antigènes du non soi) sont relargués dans la circulation et rejoignent les organes lymphoïdes secondaires tels

que la rate, les ganglions lymphatiques ou bien les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Ils peuvent alors interagir avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Dans les tissus périphériques, les CPA, notamment les cellules dendritiques présentes captent les antigènes du non soi et peuvent les présenter aux lymphocytes T CD4+ ou CD8+ via les molécules du CMH de classe I ou de classe II. Ces cellules effectrices entament alors un processus de différenciation et de polarisation cytokinique selon les cytokines produites par les cellules dendritiques à proximité et s'orientent vers une réponse T cytotoxique CD8+ ou bien une réponse T auxiliaire CD4+ active de phénotype Th1, Th2 ou Th 17 ou bien mémoire.

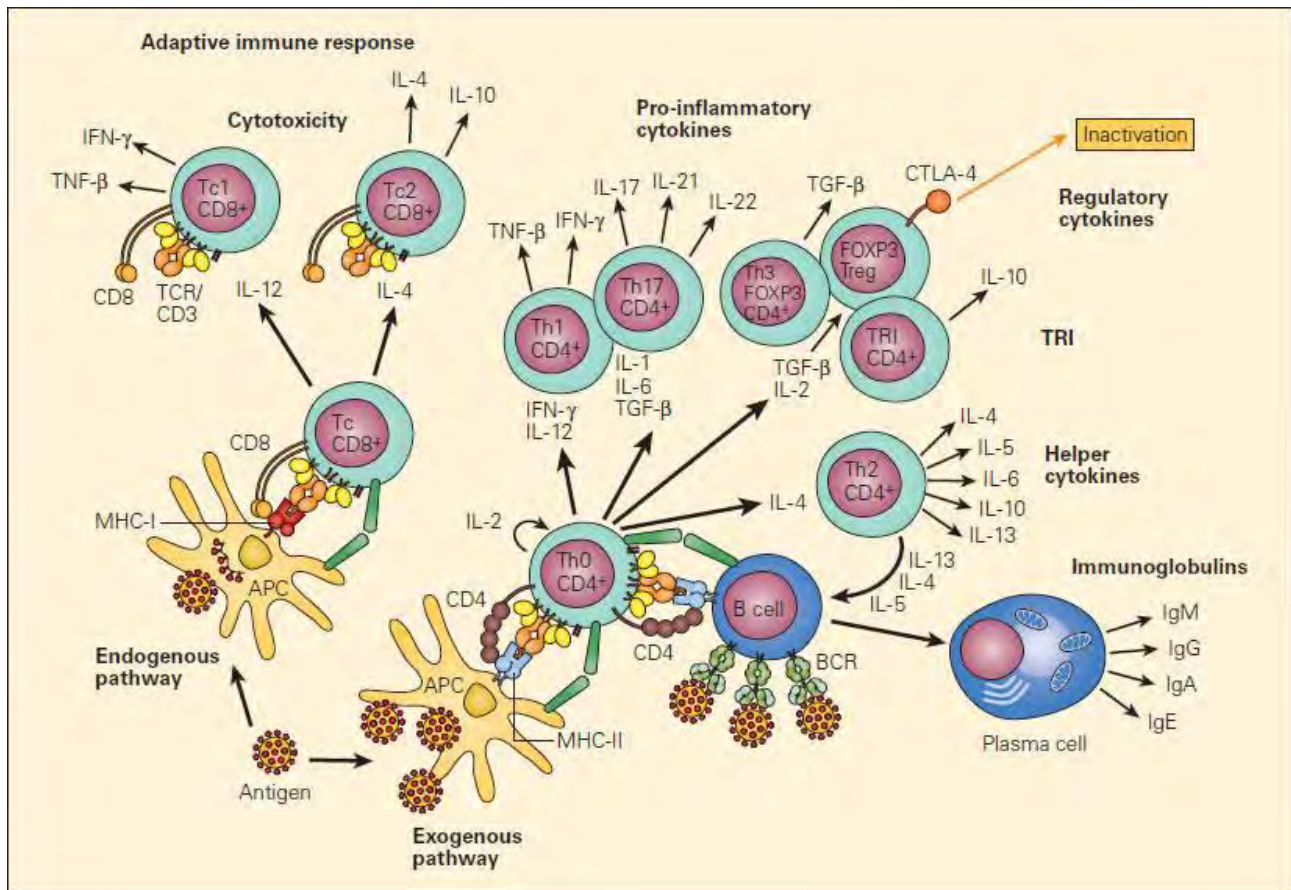


Figure 9: La différenciation lymphocytaire T. Issu de *Immunology IV: Clinical Applications in Health and Disease* ; Bellanti JA ; I Care Press, Bethesda, MD, 2012.

Le microenvironnement tumoral comprend des cellules présentatrices de l'antigène qui sont capables de capter des antigènes à partir des protéines libérées par les cellules tumorales (par apoptose ou par nécrose). Elles migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires et vers les structures lymphoïdes tertiaires. Il s'agit d'agrégats de lymphocytes présents au sein du microenvironnement tumoral et constitué d'une zone B formant parfois un centre germinatif et d'une zone T riche en cellules dendritiques.

Ces organes permettent alors les intrications entre les lymphocytes T CD4+ naïfs et les CPA exprimant un CMH de classe II/peptide antigénique. Ces interactions permettent l'activation et la différenciation des lymphocytes T en cellule effectrice qui peuvent alors effectuer leur activité effectrice au cœur de la lésion tumorale.

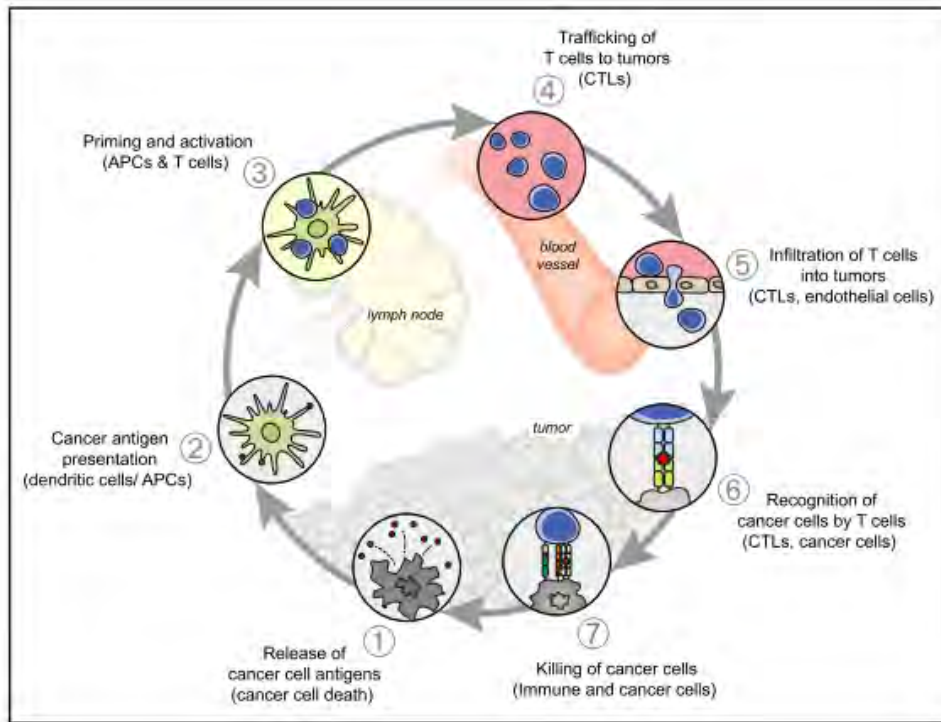


Figure 10: Le cycle de l'immunité anti-tumorale. Issu de Chen & al, 2013.

II.2 La réponse immunitaire anti tumorale dans les cancers pulmonaires

II.2.1 Le système immunitaire normal dans le tissu pulmonaire

Le poumon est un organe « barrière » au cœur des relations entre l'organisme et l'environnement et ses rôles principaux, la captation d'oxygène et le relargage de dioxyde de carbone le rendent de fait exposé à de nombreuses particules inhalées, telles que des pathogènes ou des toxines.

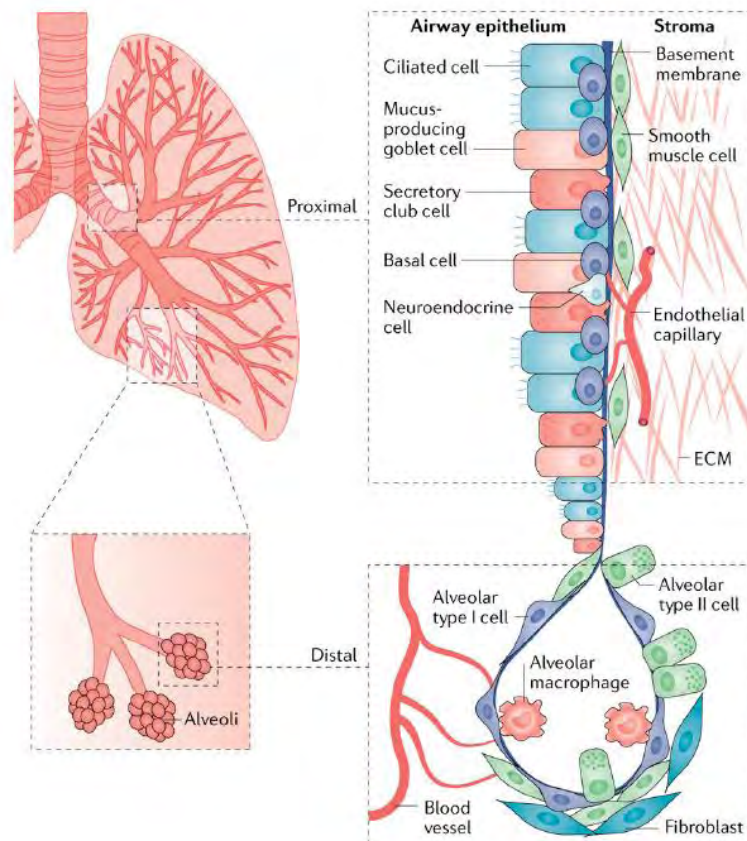


Figure 11: le microenvironnement pulmonaire normal. Issu D'Altorki & al, 2019. ECM : matrice extra-cellulaire.

Le poumon comporte schématiquement des voies respiratoires proximales, représentées par les bronches et les bronchioles et des voies respiratoires terminales où les échanges gazeux ont lieu, les alvéoles pulmonaires. Les voies respiratoires proximales sont constituées de cellules ciliées, de cellules caliciformes, de cellules basales peu différenciées et de cellules endocrines. A distance l'épithélium s'aplatit et on peut y observer la présence de cellules de Clara sécrétrices. Les alvéoles sont quant à elles tapissées par des pneumocytes de type I, jointifs et comportent quelques pneumocytes de type II responsables de la synthèse de surfactant. Les autres types cellulaires présents sont les fibres musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

Dans cet organe au cœur des échanges avec le milieu extérieur, il existe aussi des cellules immunitaires résidentes dans le poumon responsable de l'immunité locale (53) :

- **Les macrophages** : on distingue les macrophages alvéolaires résidant dans la lumière des alvéoles, des macrophages interstitiels. Les premiers présentent plusieurs fonctions mais sont principalement associés à des fonctions anti-inflammatoires et sont constamment exposés aux particules exogènes qu'elles phagocytent, d'où leur aspect « poussiéreux » (« dust » cells). Les macrophages interstitiels sont considérés comme un état provisoire entre les macrophages nouvellement recrutés et les macrophages alvéolaires considérés comme résidents. Toutefois, il semble exister une population stable aux propriétés immuno-régulatrices.(53)
- **Cellules lymphoïdes innées (ILCs)** : elles partagent de nombreuses fonctions avec les lymphocytes T mais ne disposent pas de TCR et sont sensibles aux cytokines sécrétées

localement. Elles participent à l'immunité locale contre les pathogènes et les parasites et sont impliquées dans la réparation tissulaire.

- **Les cellules NK** : dans le poumon, les cellules NK résidentes présentent un phénotype CD56 *diminué* CD16+. Leur rôle précis reste non élucidé par rapport aux cellules NK circulantes.
- **Les cellules dendritiques** : ce sont des cellules présentatrices d'antigènes et dans le poumon, leur rôle principal est la cartographie précise des pathogènes inhalés avant leur migration vers les structures lymphoïdes tertiaires où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T.
- **Les polynucléaires neutrophiles** : ce sont des cellules de l'immunité innée et leur rôle est principalement décrit dans les processus aigus infectieux. Dans le poumon, cette population résiderait dans de petits capillaires, adhérente à l'endothélium, au plus proche des alvéoles et serait capable d'intervenir rapidement dès la sécrétion de molécules associées aux agents pathogènes (comme le liposaccharide, LPS, associé aux bactéries Gram-négative). (54)

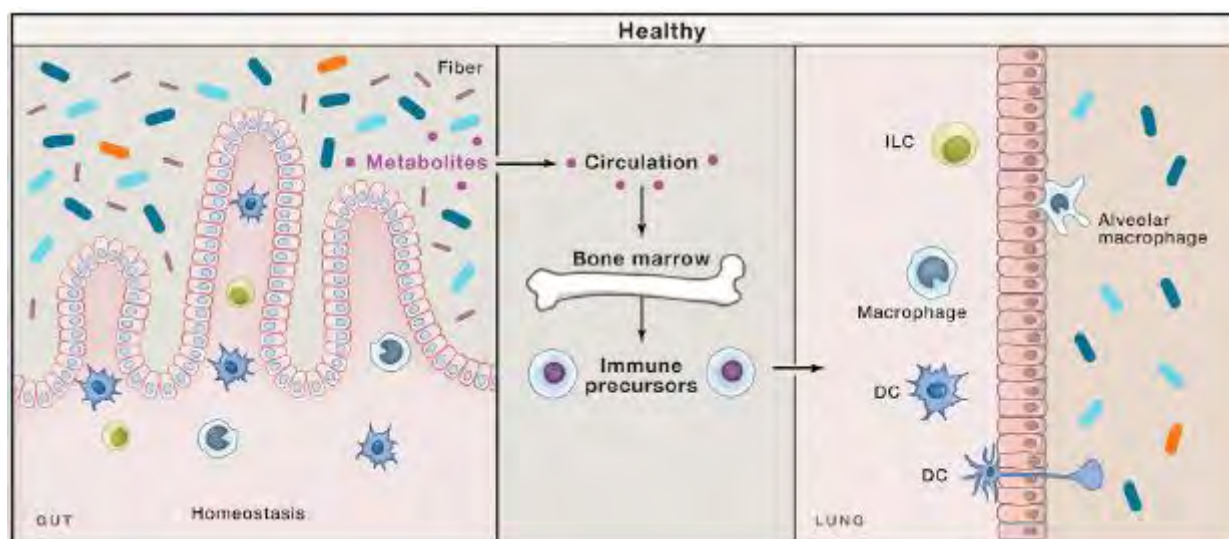


Figure 12: Homéostasie immunitaire dans le tissu pulmonaire normal. Issu de Lloyd & al, 2017.

Des états d'inflammation chronique tel que la Bronchite Pulmonaire Chronique Obstructive (BPCO) peuvent moduler le système immunitaire pulmonaire normal et exhiber des caractéristiques en faveur de la carcinogénèse. Ces patients présentent un risque relatif plus élevé que la population générale de développer un cancer pulmonaire (55) : le remodelage des voies aériennes et les altérations des cellules immunitaires résidentes du poumon dont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes produisant des taux élevés de médiateurs pro-inflammatoires favorisent la carcinogénèse.

II.2.2 Particularités de la réponse immunitaire anti-tumorale dans les carcinomes pulmonaires

Le développement tumoral ne passe pas inaperçu vis-à-vis du système immunitaire qui a la capacité de reconnaître spontanément les antigènes associés au cancer (Tumor-associated-antigens TAA), particulièrement dans les carcinomes pulmonaires. Ainsi en témoigne l'existence de nombreux syndromes paranéoplasiques médiés par des éléments du système immunitaire, tels que

les réponses immunitaires contre les protéines Hu ou bien la présence d'anticorps anti-SOX dans le sérum des patients atteints d'un cancer pulmonaire. (56,57)

Les tumeurs pulmonaires sont donc immunogènes et peuvent induire différentes réponses immunitaire. Au sein même de la tumeur, plusieurs acteurs du système immunitaire adaptatif et inné sont présents. Ils s'organisent en structures lymphoïdes tertiaire (TLSs). Ces structures immunitaires intra-tumorales sont composées de follicule B contenant des cellules T follicular helper (TFH), des macrophages à corps tingibles et un réseau de cellules folliculaires dendritiques ainsi qu'une zone T contenant des cellules dendritiques matures accompagnées par un réseau de structures vasculaires (figure ci-dessous).

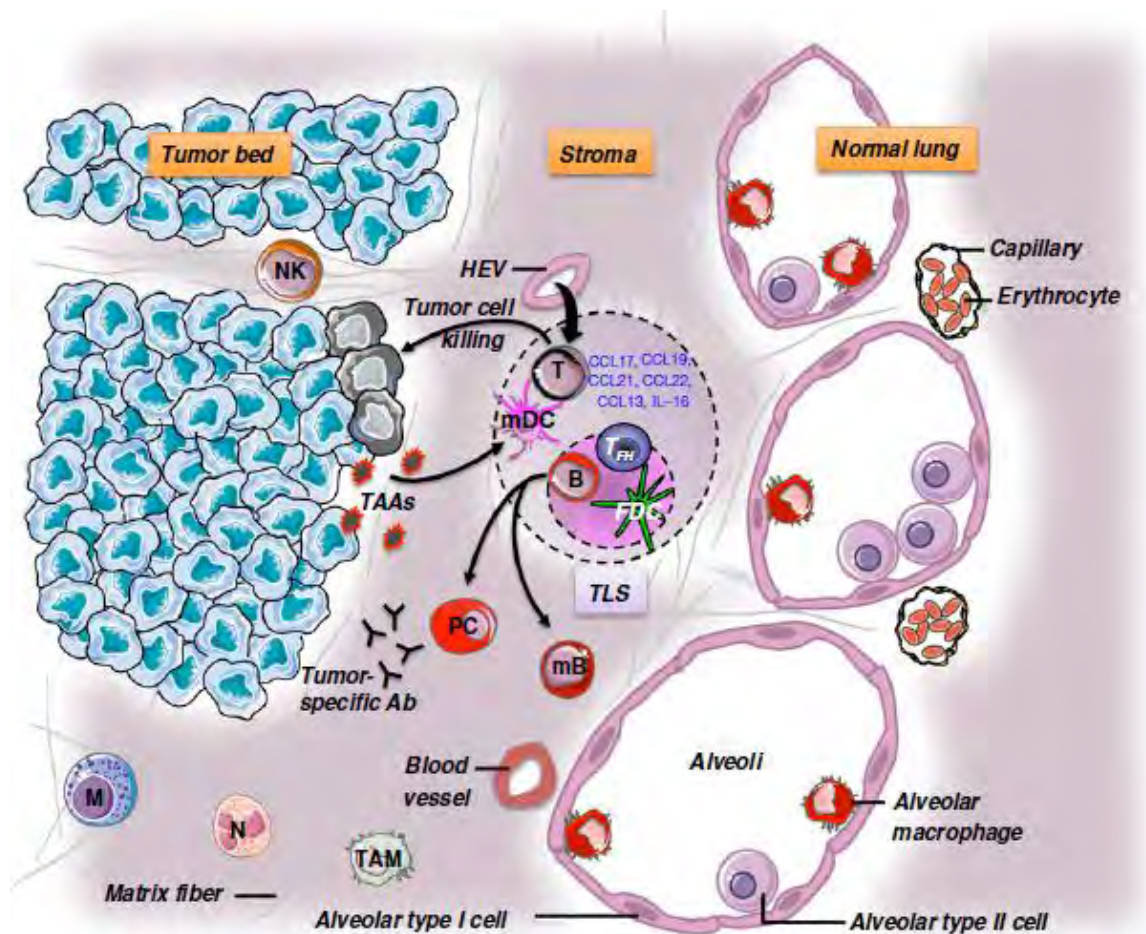


Figure 13: Le micro-environnement immunitaire dans les CPNPC. Ab = anticorps; B = lymphocyte B; FDC = cellule folliculaire dendritique; M = mastocyte; mB = lymphocyte B mémoire; mDC = cellule dendritique mature; N = polynucléaire neutrophile; PC = plasmocyte; T = lymphocyte T; TAAs = antigène associé au cancer; T_{FH} = lymphocyte T folliculaire helper. Issu de Remark & al, 2015.

Le recrutement des cellules T dans le flux sanguin s'effectue grâce à la production de nombreuses intégrines, des molécules d'adhésion et des chemokines.

Mais, le système immunitaire au sein du microenvironnement tumoral comporte une activité tantôt pro-tumorale tantôt anti-tumorale dans les carcinomes pulmonaires et les fonctions de plusieurs types cellulaires peuvent être modifiées. (43,58) Ainsi, les cellules myéloïdes appartiennent à l'immunité innée et leur rôle dans la carcinogénèse s'étoffe de jours en jours. (59) Elles peuvent également participer à l'immunité adaptative en contrôlant la composition de

l'infiltrat intra-tumoral T (TILs). (60) Les cellules dendritiques dérivent de précurseurs myéloïdes et sont initialement reconnues comme des cellules centrales de l'immunité anti-tumorale via leur capacité de cellules présentatrices d'antigènes dans les structures lymphoïdes. Néanmoins, dans les CPNPC, les cellules dendritiques peuvent exprimer des signaux inhibiteurs tel que B7-H3 (ou CD276) manquant ainsi d'activer les cellules T effectrices. (61) Elles peuvent sécréter le TGF- β qui induit la différenciation de cellules T CD4⁺ en cellules T régulatrices (T_{reg}) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ limitant ainsi la prolifération de cellules T. (62)

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM, tumor associated macrophages) sont des composants abondants dans l'infiltrat inflammatoire des CPNPC. Il présente schématiquement deux phénotypes : le phénotype M1 (avec une activité anti-tumorale et pro-inflammatoire) et le phénotype M2 (activé par la voie alternative et comportant une activité pro-angiogénique et immunosuppressive pro-tumorale). Il semble s'agir toutefois d'un continuum et face à ces deux phénotypes antagonistes, leur impact pronostique dans les CPNPC reste à élucider. Plusieurs études se sont également portées sur le rôle des cellules NK au sein des CPNPC, même si leur rôle précis reste peu élucidé. Dans les adénocarcinomes, il semble que deux populations de cellules NK cohabitent (CD16⁺ et CD16⁻) et la proportion de cellules NK est réduite par rapport au tissu pulmonaire non tumoral. (63) Toutefois, la population immunitaire majoritaire dans les infiltrats inflammatoires des CPNPC correspond aux lymphocytes T. Plusieurs études ont mis en évidence une proportion élevée de cellules T CD3⁺ dont l'influence sur le pronostic reste controversée. (63,64). L'infiltrat immunitaire dans les CPNPC comporte également de nombreux polynucléaires neutrophiles. Leur rôle précis reste à déterminer dans les CPNPC. Dans les adénocarcinomes lépidiques (anciennement bronchilo-alvéolaire), un nombre augmenté de polynucléaires neutrophiles a été retrouvé dans les lavages bronchio-alvéolaire de ces patients et semble constituer un facteur pronostique indépendant. (65)

II.2.3 Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire dans les CPNPC

Face à cette pression immunitaire, les cellules tumorales sont capables de s'adapter et développent plusieurs mécanismes d'échappement au système immunitaire.

II.2.3.1 Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1

Le mécanisme d'échappement tumoral le plus connu est l'axe PD-L1/PD-1 qui a fait l'objet de nombreux travaux dont le prix Nobel de Médecine en 2018. De nombreuses thérapies ont été mises au point et révolutionnent maintenant le traitement des patients. Le PD-1 (programmed cell death protein 1) est un récepteur inhibiteur appartenant à la famille des immunoglobulines et faisant partie de la famille des co-récepteurs CD28 régulant l'équilibre entre l'activation des lymphocytes T et la tolérance immunitaire dans les tissus. Il est exprimé notamment par les lymphocytes T activés. Ses ligands sont le PD-L1 et le PD-L2 (programmed death-ligand 1 et 2), exprimées à l'état normal par respectivement les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules des îlots pancréatiques, les astrocytes d'une part et par les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques pour le PD-L2. Le PD-L1 correspond à une protéine transmembranaire

ayant un rôle physiologique dans la régulation de l'immunité adaptative. Sa liaison avec le PD-1, notamment à la surface des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et/ou des lymphocytes T CD8⁺ entraîne un signal inhibiteur via la phosphorylation des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) par la famille des kinases Src. L'activation du PD-1 par le PD-L1 perturbe l'activité des cellules T et inhibe la prolifération, la survie, la production cytokinique et d'autres fonctions effectrices de ces cellules.(66) Dans les tumeurs, PD-1 est présent à la surface de nombreux lymphocytes intra-tumoraux (TILs ; tumor-infiltrating lymphocytes) tant au sein des TILs CD4⁺ qu'au niveau des TILs CD8⁺ reflétant ainsi un « épuisement immunitaire ». (67–69) D'autre part, PD-L1 est fréquemment surexprimé par les cellules tumorales dans les CPNPC. Ainsi, cette surexpression est à l'origine d'une inhibition immunitaire au sein du microenvironnement tumoral via l'inhibition des cellules T effectrices et régulatrices. (69)

II.2.3.2 *La perte d'expression des molécules HLA*

Dans le cancer du poumon mais également dans d'autres types de cancers solides, un des mécanismes d'échappement au système immunitaire est la perte d'expression des molécules HLA de classe I. (70–72) Cette perte d'expression permet aux cellules cancéreuses de passer inaperçue vis-à-vis des cellules immunitaires circulantes, notamment des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques lesquels présentent une activité cytotoxique à médiation cellulaire immédiate via la reconnaissance à la surface des cellules visées des antigènes associés au cancer (TAA ; Tumor-associated-antigens). (73,74) D'autre part, dans les CPNPC, il a été démontré que la perte d'expression des molécules HLA de classe I conduisait à une densité en lymphocytes T CD8⁺ diminuée par rapport aux CPNPC ayant conservé cette expression. (75) Cette perte d'expression était également un facteur indépendant de mauvais pronostic en analyse multivariée chez les patients de stade I mais pas chez les patients de stade plus avancé. Cependant, bien que la littérature soit unanime quant à la forte prévalence de la perte d'expression des molécules HLA de classe I dans les CPNPC, il semble que son implication pronostique reste encore à prouver.

II.2.3.3 *Autres systèmes d'échappement au système immunitaire*

Depuis l'avènement de l'immunothérapie et notamment des molécules ciblant l'axe PD-1/PD-L1, d'autres mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire ont été découverts, et notamment d'autres points de contrôle immunitaire. Ainsi, LAG-3 (Lymphocyte activating 3 gene) est un point de contrôle dont le rôle dans les CPNPC est sujet à de nombreux travaux. Il est présent à la surface de nombreuses cellules immunitaires dont des lymphocytes NK, des lymphocytes B, ... Il est exprimé par les TILs dans certains CPNPC et son expression est corrélée à celle de l'axe PD-1/PD-L1. D'autre part, il semble jouer un rôle dans la récurrence de la maladie tumorale et serait un facteur de mauvais pronostic.(76)

De même, TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain) est un nouveau point de contrôle prometteur. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire co-inhibitrice. Il a été décrit pour la première fois en 2009 à la surface des cellules T et NK. (77,78) Il est exprimé exclusivement par les cellules T dont les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes T_{FH}. De plus, dans de nombreux

processus tumoraux, il est exprimé par les lymphocytes intra-tumoraux (TILs). (79) Les voies de signalisation intra-cellulaire associées à ce point de contrôle ne sont pas encore tout à fait élucidées mais il semble qu'elles inhibent l'activité lymphocytaire T via l'inhibition du récepteur des cellules T (TCR (T cell receptor)). Il pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales.

III. Nouvelle piste dans l'immunothérapie : le point de contrôle immunitaire HLA-E/ β 2microglobuline

Les cellules tumorales sont soumises en permanence à la pression du système immunitaire et de nombreuses voies d'échappement sont ainsi favorisées. Une des voies connue au sein des processus tumoraux est l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire et plus particulièrement aux cellules T CD8⁺ effectrices via l'absence d'expression des molécules HLA classique du CMH de classe 1 (HLA-A, HLA-B et HLA-C) à leur surface leur permettant ainsi une absence de reconnaissance par les cellules T effectrices CD8⁺.(80) Si cette voie est aujourd'hui largement étudiée, il semble également que les cellules tumorales soient également capables d'exploiter le rôle des molécules HLA du CMH de classe 1 dits non classique, telles que HLA-E.

III.1 Le ligand HLA-E- β 2m et rôle physiologique

La molécule HLA-E, Human Leukocyte antigen-E appartient au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe Ib, dit non classique. Elle est codée par le gène HLA-E présent sur le chromosome 6 et comprenant 8 exons. La molécule HLA-E est une protéine transmembranaire de 45 kDa et comporte 358 acides aminés. Elle est caractérisée par un polymorphisme limité et est ancrée à la membrane cytoplasmique des cellules sous la forme d'un hétérodimère constitué d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère, la β 2-microglobuline. En effet, elle n'est fonctionnelle que sous la forme de cet hétérodimère.

A l'état physiologique, le couple HLA-E/ β 2-microglobuline est exprimé notamment par les cellules endothéliales et certaines cellules du système immunitaires. Néanmoins, son expression n'est pas spécifique et peut être constatée dans tous les tissus. (81)

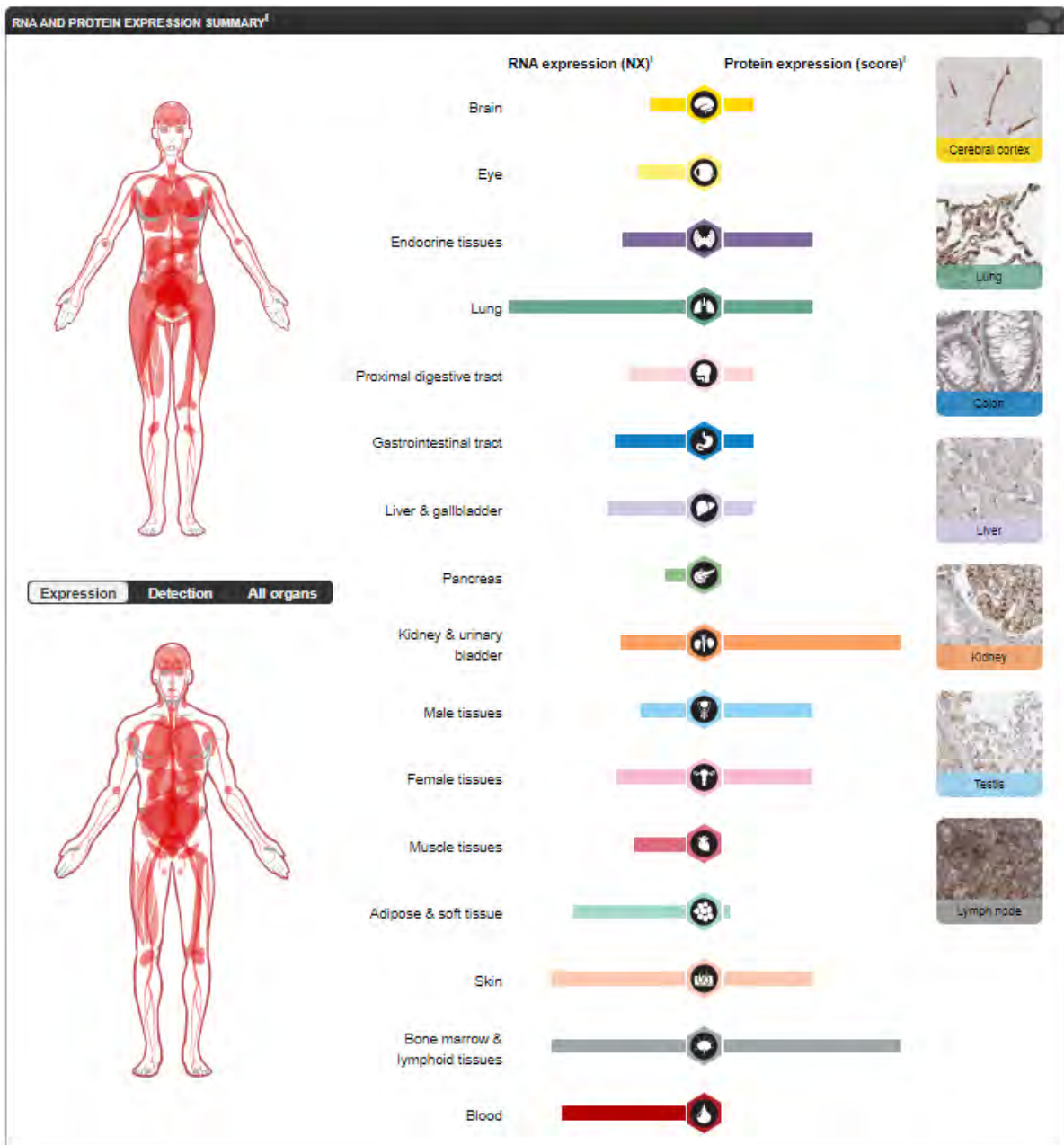


Figure 14: profil d'expression de la molécule HLA-E dans le corps humain(81)

Les molécules du CMH de classe I non classique, contrairement aux molécules du CMH de classe I classique qui interviennent dans l'immunité adaptative et interagissent avec le TCR (T cell receptor) des lymphocytes T CD8+, sont très peu polymorphes (la protéine HLA-E ne compte que deux isoformes protéiques efficaces) et jouent un rôle majeur dans l'immunité innée. En effet, elles interagissent avec les cellules de l'immunité innée, telles que les cellules NK via la famille des récepteurs de type lectine-C CD94/NKG2. Il s'agit d'hétérodimères formés par une protéine invariable CD94 à laquelle s'associe une glycoprotéine NKG2 soit inhibitrice, NKG2a, soit activatrice NKG2c. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules NK, mais aussi par une sous-population de lymphocytes TCD8+ et par des lymphocytes dit NKT (ces lymphocytes expriment à la fois les récepteurs NK et le TCR et peuvent sécréter des cytokines).

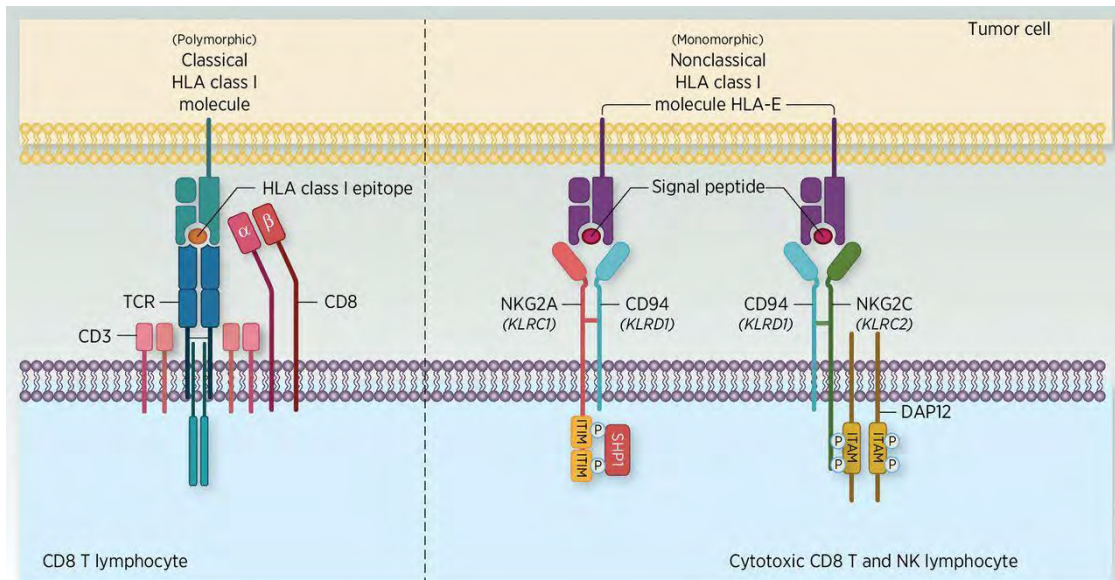


Figure 15: Interactions entre le ligand HLA-E/β2m et son récepteur CD94-NKG2(82)

A l'état physiologique, le ligand HLA-E/β2m est principalement un médiateur de l'immunité innée et participe à l'activation ou l'inhibition des cellules NK.(83,84) En effet, l'affinité d'HLA-E/ β2m pour son récepteur inhibiteur CD94/NKG2A est six fois supérieure à celle pour son récepteur activateur CD94/NKG2C. Ainsi, il semble jouer un rôle prépondérant dans la tolérance au soi et l'immunorégulation des réponses immunitaires. Des modifications peptidiques d'HLA-E ont un impact majeur sur sa capacité à se lier à ses récepteurs et certains pathogènes, tels que les virus, sont capables de modifier l'expression des molécules d'HLA-E à la surface des cellules infectées et modifient ainsi son interaction avec les cellules NK. (85)

De plus, le couple HLA-E/ β2m est également capable d'interagir avec une sous-population de cellules T CD8+ via l'activation du récepteur CD94/NKG2 exprimé par ces lymphocytes T non conventionnels.(86)

III.2 Implication du point de contrôle HLA-E/ β2m – CD94/NKG2A dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale

Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle d'HLA-E dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale dans différents types de cancers (Cf tableau 3), plus précisément, l'expression aberrante d'HLA-E par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immunitaire. Différents travaux, ont montré que cette expression aberrante du ligand HLA-E/β2m induisait l'inhibition des cellules NK ou T CD8+ via l'activation du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A avec un impact pronostique, notamment dans les cancers colo-rectaux (87,87,88)

Tableau 3: Particularités de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m dans différents tissus tumoraux

Cancer	Particularités de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m
Tumeurs gliales (89)	<ul style="list-style-type: none"> - surexpression significative dans les gliomes de haut grade versus les gliomes de bas grade - surexpression plus importante dans les astrocytomes diffus versus les oligodendrogliomes. - l'expression HLA-E est un marqueur pronostic indépendant péjoratif
Cancer de l'ovaire (90)	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression d'HLA-E corrélée à un pronostic défavorable dans les carcinomes séreux ovariens
Cancer du sein (91)	<ul style="list-style-type: none"> - surexpression d'HLA-E dans 50% des carcinomes mammaires dans une cohorte de 677 patients - impact pronostique significatif de la surexpression d'HLA-E dans les carcinomes mammaires chez les patients avec une perte de l'expression tumorale des molécules du CMH de classe 1 classique
Cancer colorectal (CCR) (92–94)	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression par les cellules tumorales des CCR du couple HLA-E/β2m, particulièrement dans les carcinomes en bague à chatons, les adénocarcinomes mucineux et les adénocarcinomes médullaires - association significative entre la surexpression du couple HLA-E/β2m et la densité de l'infiltrat immunitaire cytotoxique CD8+CD94+ intra-épithélial (IEL-TIL) - surexpression d'HLA-E/β2m statistiquement associé à un pronostic défavorable dans les CCR.
Cancer du pancréas (adénocarcinome) (95)	<ul style="list-style-type: none"> - Surexpression HLA-E et HLA-G significativement associé à un pronostic défavorable - rôle favorisant de l'IFNγ.
Cancer rénal (96)	<ul style="list-style-type: none"> - Expression hétérogène d'HLA-E au sein des carcinomes rénaux avec une prédominance nette dans les carcinomes chromophobes - Absence d'association entre l'expression d'HLA-E et la densité en cellules immunitaires CD3+,CD8+,CD4+ et FOXP3+ - Corrélation inverse entre l'expression d'HLA-E et la densité en cellule CD56+ - l'expression d'HLA-E n'est pas statistiquement corrélée à diminution de la survie dans les carcinomes rénaux
Mélanome (97)	<ul style="list-style-type: none"> - Expression ex-vivo d'HLA-E intracellulaire dans des lignées cellulaires de mélanomes, sans expression membranaire - Production d'une forme soluble d'HLA-E par ces cellules - Surexpression par des mélanocytes tumoraux d'HLA-E sur des sections tumorales

D'autre part, cette surexpression s'associe à une densité augmentée des TILs CD8+ CD94+ dans les cancers de l'ovaire et le cancer colo-rectal. Certaines de ces études montrent également que les TILs CD8+ expriment le récepteur inhibiteur CD94/NKG2a. Ces éléments sont à mettre en parallèle avec le fait que la surexpression d'HLA-E est associée à un pronostic défavorable notamment dans les cancers de l'ovaire (90) et dans les cancers colo-rectaux (93,94)

Ainsi ces travaux laissent entrevoir un probable mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire via la surexpression d'HLA-E/ β 2m et l'inhibition des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral via le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A.

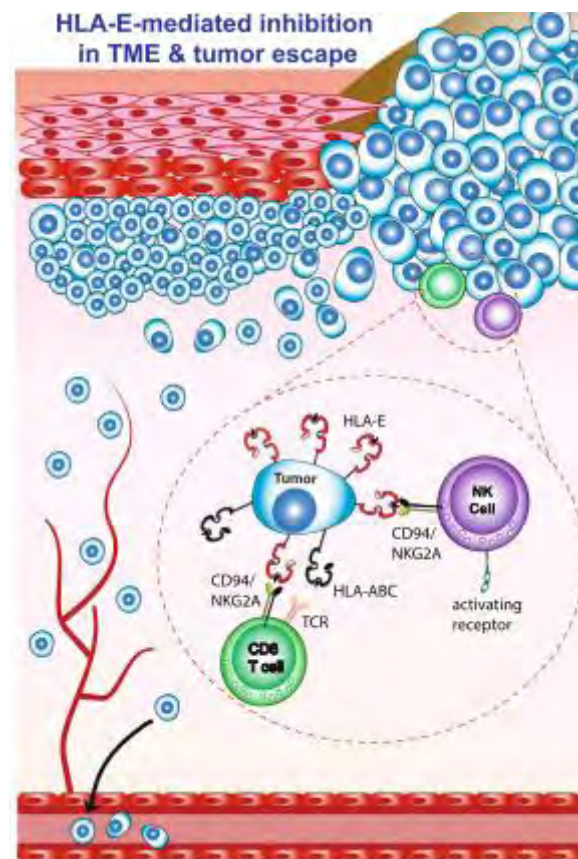


Figure 16: Mécanismes d'inhibition du système immunitaire intra-tumoral par la surexpression du ligand HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales. Issu de Von Hall & al, 2019.

III.3 Perspective de traitement : le Monalizumab et essais en cours

Récemment, un anticorps a été mis au point et commercialisé, le Monalizumab. Celui-ci cible la chaîne NKG2A du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A et bloque donc son effet inhibiteur. Il est actuellement testé dans plusieurs essais cliniques de phase II.

Tableau 4: Essais impliquant le Monalizumab

Cancer	Essai	Résultats préliminaires
Carcinome colorectal (CCR)	Novel Oncology Therapies in Combination With Adjuvant Chemo in High-risk MSS-CRC	Essai interrompu
Cancer ORL	- Phase 2 INTERLINK-1 : évaluation de la tolérance du traitement Cetiximab + Monalizumab chez des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou récurrent ou métastatique après chimiothérapie par platines et après traitement par anti-PDL-1 - Efficacy Study of Pre-operative IPH2201 in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity	- profil de tolérance bon - résultats encourageants dans les R/M SCCHN après chimiothérapie à base de platines et post-traitement par anti-PDL-1 - Phase 3 en cours : essai clinique randomisé combinaison Monalizumab+Cetuximab vs Cetiximab + Placebo chez des patients présentant un CE de la tête et du cou récurrent ou métastatique après chimiothérapie par platines et après traitement par anti-PDL-1.
Tumeurs solides avancées	A Study of Durvalumab (MEDI4736) and Monalizumab in Solid Tumors	Etude en cours
Cancers gynécologiques	A Dose-Ranging Study of IPH2201 in Patients With Gynecologic Malignancies	58 patients évaluables avec bonne tolérance du Monalizumab et une stabilisation à court terme
Cancers pulmonaires	- Durvalumab Alone or in Combination With Novel Agents in Subjects With NSCLC - Precision Immuno-Oncology for Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients With PD-1 ICI Resistance	Etude en cours Inclusion en cours

Concernant le CPNPC, peu d'études se sont penchées sur l'expression d'HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales des CPNPC et son interaction avec les TILs du microenvironnement tumoral.

Ce récepteur CD94/NKG2A étant une cible thérapeutique très intéressante, il paraît indispensable d'analyser précisément le statut de ce couple dans les cancers pulmonaires non à petites cellules en fonction des caractéristiques cliniques, morphologiques et moléculaires des cellules tumorales afin d'améliorer la réponse à l'immunothérapie notamment.

But de l'étude

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail sont de déterminer :

- L'expression du ligand HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales en fonction des caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires,
- La corrélation entre l'expression du couple HLA-E/ β 2m et la densité en TIL intra-épithéliaux (IEL) CD3+, CD8+ NKp46+ ou NKG2A+,
- L'impact pronostique de la surexpression de HLA-E/ β 2m et de la densité en TIL-IEL.

Patients et méthodes

I. Patients

Cette étude est basée sur une cohorte de 42 patients opérés d'un CPNPC (adénocarcinome ou carcinome épidermoïde) résécable au diagnostic au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nantes entre 2005 et 2015 et pour lesquels nous disposons d'échantillons conservés en paraffine de tumeur et de parenchyme pulmonaire indemne appariés et archivés au sein du service d'anatomie pathologie du CHU de Nantes.

Tous les patients inclus ont signé un consentement à l'utilisation de leurs prélèvements à visée de recherche.

II. Critères d'inclusion et d'exclusion

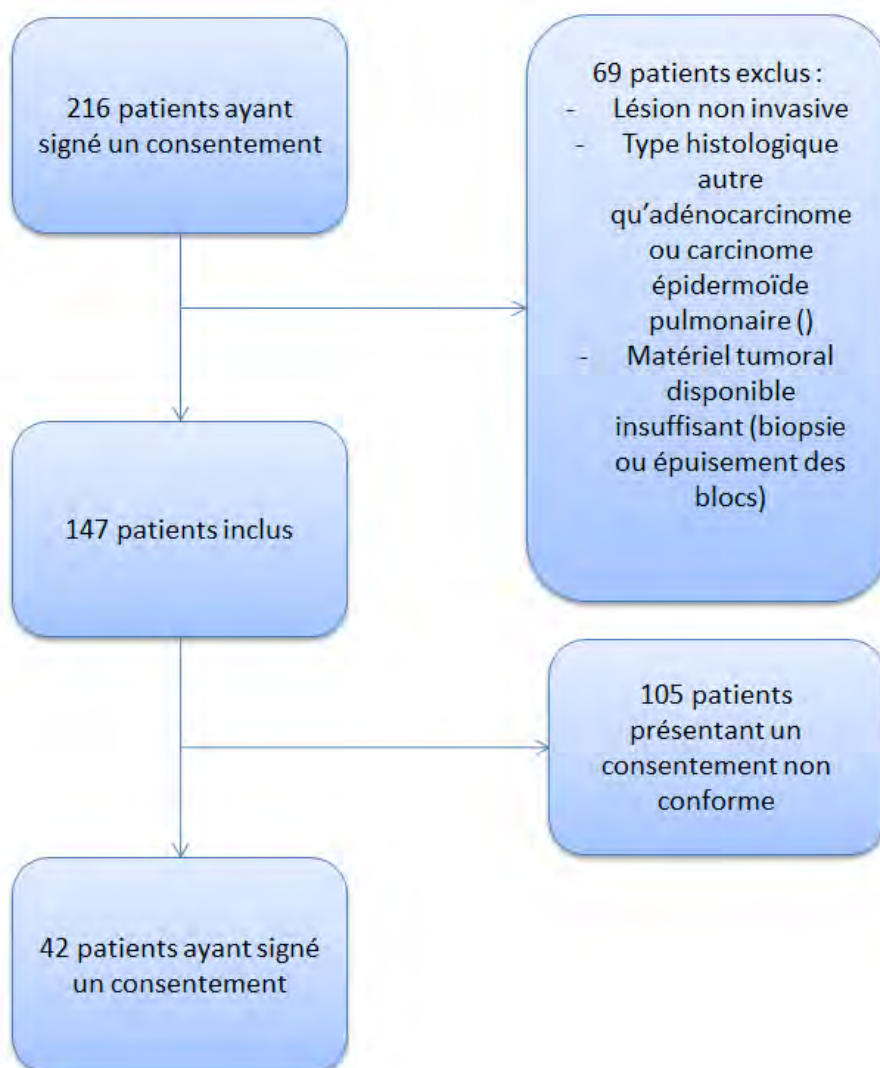


Figure 17: Flowchart de l'étude

Dans un premier temps, les patients ont été sélectionnés à partir d'une base de données de patients pris en charge au CHU de Nantes dans le cadre d'une pathologie thoracique tumorale ayant signé un consentement à l'utilisation de leur prélèvements à visée de recherche.

Étaient exclus de l'étude les patients pour lesquels le type histologique n'était ni un adénocarcinome, ni un carcinome épidermoïde pulmonaire, dont le caractère invasif de la prolifération tumorale n'était pas confirmé et ceux dont le matériel tissulaire disponible pour les études immunohistochimiques était insuffisant (biopsies ou matériel insuffisant). Sur les 147 patients inclus, seuls 42 ont fait l'objet de cette étude ; 105 d'entre eux ne présentant pas un consentement conforme.

III. Recueil des données cliniques

Pour chaque patient, les caractéristiques cliniques suivantes étaient recueillies :

- âge
- sexe
- la consommation de tabac, son sevrage ainsi que l'estimation en PA de la consommation
- les antécédents néoplasiques, la localisation de la néoplasie antérieure et le traitement mis alors en place (chimiothérapie, radio-chimiothérapie, radiofréquence, hormonothérapie)
- les pathologies pulmonaires préexistantes (emphysème, BPCO, exposition à l'amiante documentée dans le dossier, ...)
- le caractère symptomatique ou non au diagnostic
- le mode de diagnostic (biopsies bronchiques sous fibroscopie bronchique, biopsie sous TDM, examen extemporané, diagnostic sur pièce opératoire, ...)
- la chirurgie proposée, associée ou non à un curage ganglionnaire et la nécessité ou non d'une résection complémentaire
- l'administration d'une chimiothérapie post-opératoire immédiate
- la date de récurrence ou de décès et la date de dernière visite

Pour les analyses de survie, la survie globale correspond à la durée entre la date d'intervention et le décès ou la date de censure. La survie sans progression correspond à la durée entre la date d'intervention et la date de récurrence ou de métastases ou de décès. La durée de suivi a été censurée à 5 ans.

IV. Etude morphologique

Pour chaque patient inclus dans l'étude, les lames ayant permis le diagnostic initial ont été relues par un pathologiste débutant. Le type histologique et le sous-type histologique ont été déterminés selon la classification OMS 2015.

Pour les adénocarcinomes, la présence d'un contingent micropapillaire (exprimé en proportion de la surface tumorale examinée) a été recueillie. De même, pour les carcinomes épidermoïdes, le caractère kératinisant ou non de la prolifération tumorale était recueilli.

Le stade pTNM a été recueilli à partir du compte-rendu définitif anatomopathologique et a été révisé selon la 8^{ème} édition de la classification des tumeurs publiée par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer).

V. Etude phénotypique

V.1 Sélection des zones d'intérêt

Pour chaque patient, la relecture des lames utilisées pour le diagnostic initial a permis de sélectionner deux blocs d'intérêt : un bloc représentatif de la tumeur, englobant le front d'invasion et un bloc de parenchyme pulmonaire normal à distance de la tumeur.

V.2 Technique immunohistochimique

Les études immunohistochimiques ont été réalisées sur un automate (Dako, Autostainer Link 48) sur des coupes déparaffinées de 4µm issus des blocs sélectionnés préalablement.

Les anticorps suivants ont été utilisés :

- HLA-E (anticorps monoclonal de souris, clone MEM-E/02, 1/200^{ème}, Serotec)
- β2-microglobuline (anticorps monoclonal de souris, clone SC11.1, 1/200^{ème})
- CD 8 (anticorps monoclonal de souris, clone C8/144B, 1/100^{ème}, Dako), marqueur des lymphocytes T cytotoxiques
- CD 3 (anticorps monoclonal de lapin, 1/100^{ème}, Dako), marqueur des lymphocytes T
- NKp46 (anticorps monoclonal de souris, clone 195314, 1/50^{ème}, R&D Systems), marqueur spécifique des cellules NK
- NKG2A (anticorps monoclonal de lapin, 1/50^{ème}, Abcam)
- PD1 (anticorps monoclonal de souris, clone NAT105, 1/200^{ème}, Abcam)
- PDL1 (anticorps monoclonal de souris, clone 22C3, 1/50^{ème}, Agilent)

V.3 *Evaluation de l'expression des anticorps*

V.3.1 *PD-L1*

L'expression du PD-L1 était évaluée par un pathologiste (NL) par une méthode semi-quantitative selon les recommandations établies par les différentes sociétés savantes.(98) Un score TPS (Tumor Proportion Score) a été établi : il correspond à la proportion de cellules tumorales viables présentant un marquage membranaire partiel ou complet avec un degré d'intensité de 1+ à 3+ parmi toutes les cellules tumorales viables présentes sur la lame d'immunohistochimie.

$$\text{TPS} = \frac{\text{nombre de cellules tumorales viables PDL1 positives}}{\text{nombre de cellules PDL1 positives} + \text{nombre de cellules PDL1 négatives}} \times 100$$

Un seuil de positivité de supérieur ou égal à 1% a été retenu dans cette étude.

V.3.2 *HLA-E et β 2m*

L'expression de HLA-E et de la β 2m était évaluée conjointement par 2 pathologistes (CB et NL) par une méthode semi-quantitative utilisée dans les travaux antérieurs. (93) Brièvement, nous avons considéré l'intensité du marquage et le pourcentage de cellules tumorales positives par incrément de 5%, le seuil de positivité retenu étant 10% de cellules tumorales HLA-E positives. L'expression d'HLA-E et β 2m était également évalués dans les tissus sains appariés (épithélium bronchique et épithélium pneumocytaire).

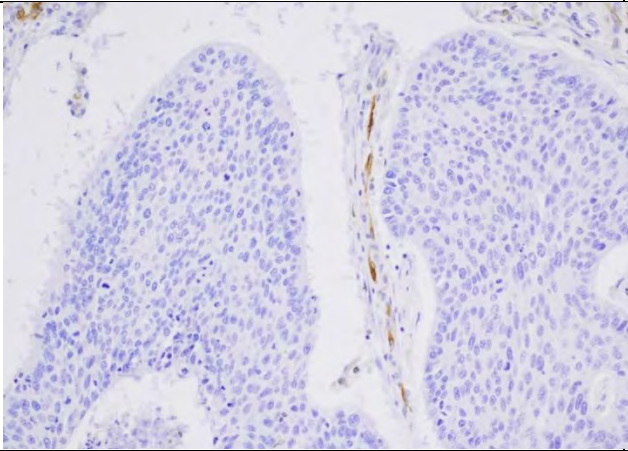
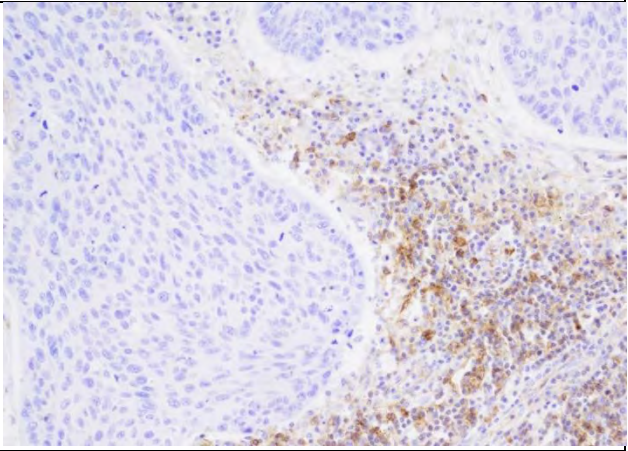
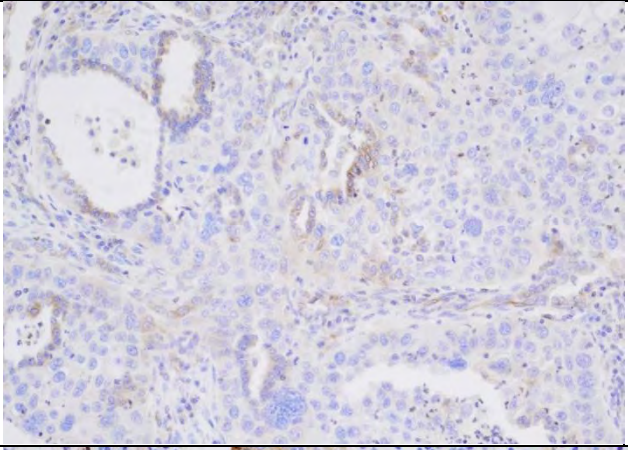
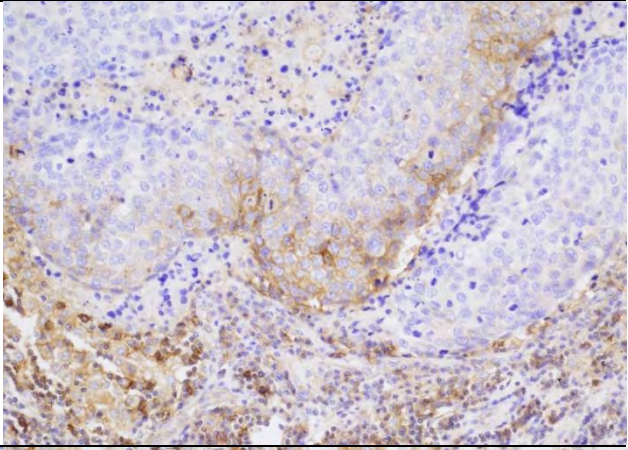
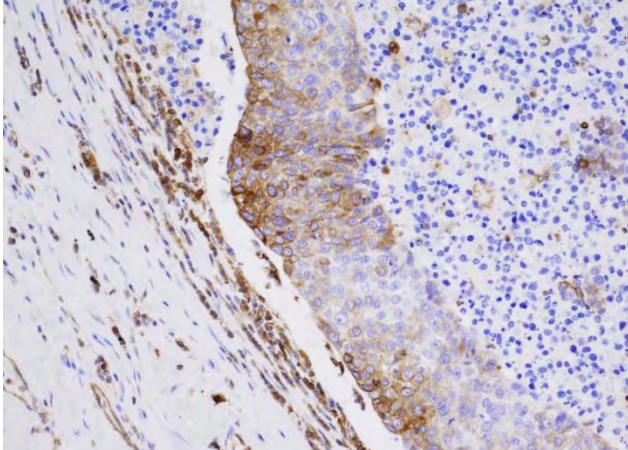
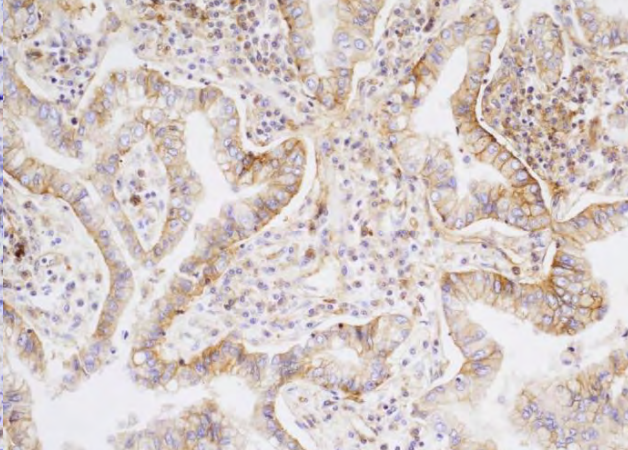
La grille suivante a été utilisée :

0 : pas d'expression de l'antigène par les cellules tumorales.

1 : Marquage cytoplasmique et membranaire minime à modéré, dont l'intensité est comparable à celles des cellules épithéliales normales de l'épithélium bronchique et des pneumocytes.

2 : Marquage cytoplasmique et membranaire modéré à intense, dont l'intensité est supérieure à celles des cellules épithéliales normales de l'épithélium bronchique et des pneumocytes (surexpression aberrante).

Tableau 5: Exemples de quantification de l'expression d'HLA-E et de la β 2-microglobuline. Grossissement x20, lames d'immunohistochimie avec les anticorps anti-HLA-E et anti- β 2microglobuline

	HLA – E	β 2m
0		
1		
2		

Les témoins internes positifs pris en compte pour l'expression d'HLA-E étaient les cellules endothéliales et les lymphocytes.

Pour qualifier une surexpression du couple HLA-E/ β 2m, un score 2 pour HLA-E (pour au moins 10% des cellules tumorales) était requis avec une expression conjointe de β 2m (score 1 ou 2).

V.3.3 Marqueurs lymphocytaires

Les lames d'immunohistochimie anti-CD3, CD8, NKG2A et NKP46 ont été numérisées sur la plateforme Micropicell avec le scanner de lames Nanozoomer HAMAMATSU et ont été analysées grâce au logiciel Qpath. Deux zones de hot spot de 1 mm² (une au niveau du front d'invasion et une au centre de la tumeur) par lames ont été sélectionnées pour chacune. Les secteurs intra-épithéliaux ont ensuite été contourés grâce aux outils disponibles dans le logiciel Qpath. Pour le compte des cellules immunitaires, seules les cellules en contact avec les cellules tumorales épithéliales, c'est-à-dire les lymphocytes intra-tumoraux intra-épithéliaux (TIL-IELs) étaient prises en compte. Les éléments immunitaires présents dans le stroma n'étaient pas comptés.

Un compte des cellules positives étaient alors réalisées via l'outil « positive cell detection » avec des paramètres ajustés pour chacune des lames analysées et le rapport entre le nombre de cellules positives et le nombre de cellules intra-épithéliales était alors recueilli. Un contrôle visuel par un pathologiste des cellules considérées comme positives par le logiciel était réalisé.

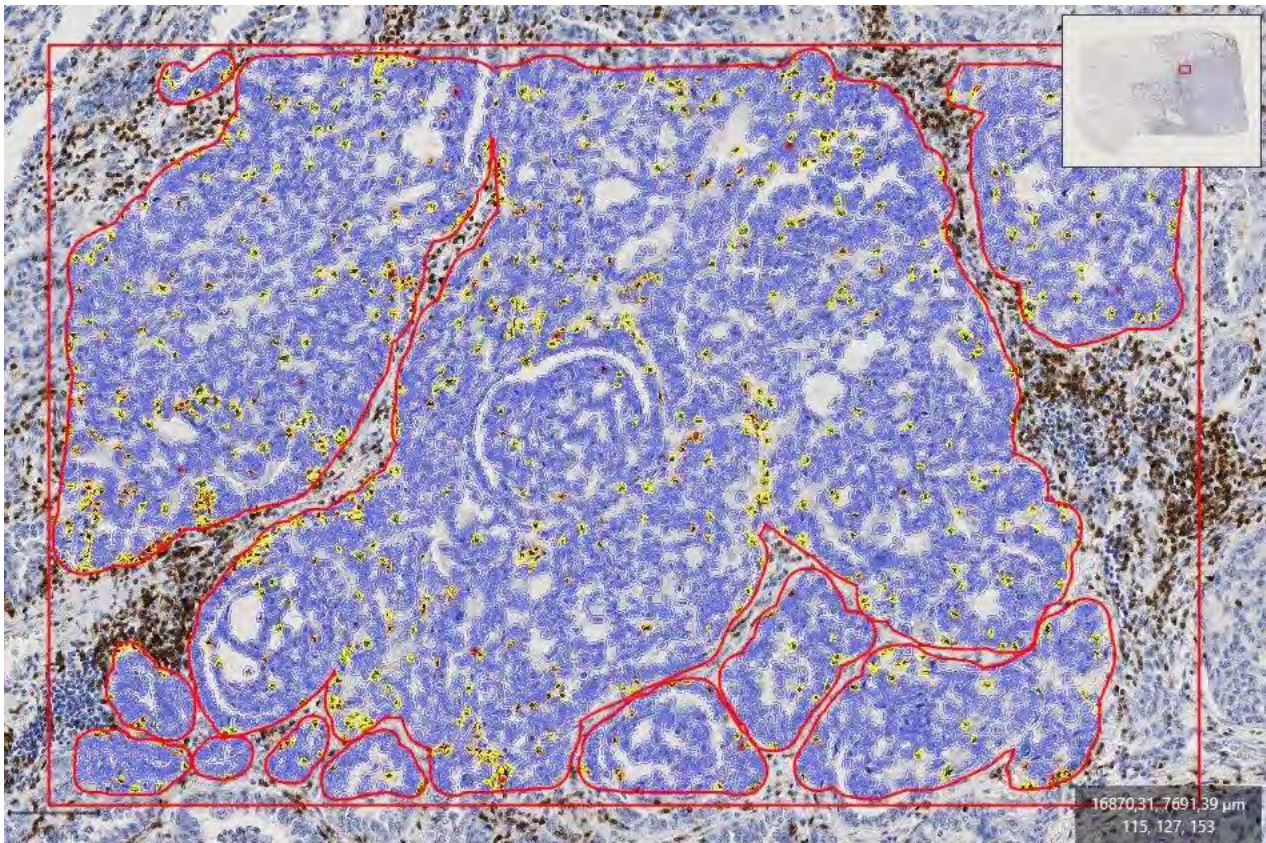


Figure 18: Exemple de compte des TIL-IELs à l'aide du logiciel Qpath. Rectangle rouge : délimitation 1mm²; délimitation des massifs tumoraux en rouge. Un cercle bleu correspond à une cellule considérée comme négative et un cercle jaune, orange ou rouge correspond à une cellule considérée comme positive.

VI. Détermination du statut EGFR

Le statut EGFR de chaque patient a été déterminé en biologie moléculaire. L'ADN tumoral de chaque échantillon a été extrait pour l'ensemble de la cohorte à partir de matériel tissulaire formolé et inclus en paraffine. Le bloc d'intérêt et la zone tumorale ont été sélectionnés par un pathologiste expert puis la zone tumorale d'intérêt délimitée par calque sur lames blanches comportant les coupes épaisses de 10µm du bloc d'intérêt. Les lames ainsi sélectionnées ont été prise en charge par la plateforme de biologie moléculaire du CHU de Nantes. La recherche du statut EGFR a été effectuée après extraction de l'ADN tumoral : une recherche de la délétion de l'exon 19 et des mutations L858R et L861Q (exon 21) du gène EGFR a été réalisée grâce à des techniques de PCR spécifique d'allèle (exon 21) ou de PCR et analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide (exon 19).

VII. Cytométrie en flux – analyse phénotypique des TIL

Une caractérisation phénotypique des TIL ex vivo a pu être réalisée dans 6 cas de cancer du poumon non à petites cellules, sur des fragments de tumeur. Les caractéristiques clinico-pathologiques de ces 6 patients opérés au CHU de Nantes sont mentionnées dans le tableau 6.

Tableau 6 : données clinico-pathologiques des cancers du poumon non à petites cellules dont la tumeur a été étudiée en cytométrie en flux

patient	sexe, âge	histologie	stade
P1	H, 59	grandes cellules peu différenciées	pT2N0
P2	F, 42	adénocarcinome acineux	pT3N1b
P3	H, 74	carcinome épidermoïde	pT3N0
P4	F, 78	adénocarcinome acineux	pT2N1b
P5	F, 63	adénocarcinome acineux	pT2aN0
P6	H, 60	carcinome épidermoïde	pT4N1b

La tumeur (0,5 à 1cm³), prélevée à l'état frais par un pathologiste du CHU de Nantes, est découpée en petits fragments qui sont congelés dans une solution de DMSO (diméthylsulfoxyde) 10% dans du SVF (sérum de veau foetal), dans un tube de 2ml, et stockés à -80°C. Cette technique de congélation n'altère pas la viabilité des TIL (voir chapitre résultats). Pour la décongélation des échantillons, les tubes sont placés pendant 1 à 2 minutes au bain-marie à 37°C et le contenu lavé dans 30mL de milieu RPMI puis centrifugé. Plusieurs sont alors nécessaires :

- Dissociation mécanique de la tumeur : Les fragments de tumeur sont émincés à l'aide de scalpels dans une boîte de Pétri dans du milieu RPMI. Le broyat (4mL) est soumis à une dissociation mécanique dans un tube Gentle Macs à l'aide du dissociateur Gentle MacsTM

(Miltenyi Biotec; 2 cycles de 30sec). La dissociation mécanique est préférée à la dissociation enzymatique, qui altère certains épitopes membranaires. L'homogénat est filtré sur un tamis cellulaire de 40mm (ClearLine cell strainer, Dutscher). Le nombre de cellules présent dans la suspension cellulaire obtenue est évalué à l'aide d'une cellule de Malassez.

- Panels de multimarquage des TILs ex vivo et analyse en cytométrie en flux : afin de caractériser et quantifier certaines populations présentes dans le microenvironnement tumoral, notamment les lymphocytes T, les cellules CD94/NKG2A+, les cellules NK et NK-T, nous avons utilisé 2 multimarquages (MM, 10 à 11 fluorochromes) : l'un (MM1), préalablement utilisé dans le laboratoire dans le cancer du côlon, réalisé sur la tumeur des patients P1 à P3 ; l'autre (MM2), mis au point dans cette étude avec l'aide de la plateforme Cytocell, pour caractériser plus finement certaines sous-populations dans le cancer du poumon (CD4/CD8, NKG2A/NKG2C notamment), réalisé sur la tumeur des patients P4 à P6.

Les cellules issues de la dissociation de la tumeur sont reprises dans du PBS/BSA 0.01% et réparties dans une plaque 96 puits à fond V (106 cellules par puits). Les cellules sont ensuite incubées dans un mélange contenant un marqueur de viabilité et 1) des anticorps couplés à différents fluorochromes ou 2) leurs isotypes contrôles correspondants, pendant 30 minutes à 4°C, dans 50mL de tampon «Brilliant Stain Buffer» (Becton Dickinson). La composition du mélange d'anticorps pour les 2 multimarquages utilisés est précisée dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 7: Anticorps utilisés dans les 2 multimarquages pour la cytométrie en flux (FVS : fixable viability stain ; BD : Becton Dickinson ; TCR : T cell receptor ; APC : allophycocyanine ; PE : phycoérythrine ; FITC : fluoresceine isothiocyanate, BV brilliant blue ; BUV : brillant ultraviolet)

Multimarquage 1						Multimarquage 2					
Anticorps	Fluorochromes	Isotype	Concentration initiale	dilution	Référence	Anticorps	Fluorochromes	Isotype	Concentration initiale	dilution	Référence
FVS 780 (marqueur de viabilité)	APC-H7	-		1/1000	BD 565388	FVS 780 (marqueur de viabilité)	APC-H7	-		1/1000	BD 565388
CD3	BUV395	IgG1, κ	50µg/ml	1/10	BD 563546	CD3	BUV395	IgG1, κ	200µg/ml	1/40	BD 563546
NKp46	PECy7	IgG1, κ	25µg/ml	1/10	Biologend 331916	CD4	BUV496	IgG1, κ	25µg/ml	1/20	BD 612936
CD16	BV421	IgG1, κ	100µg/ml	1/30	BD 562874	CD8	BV510	IgG1, κ	200µg/ml	1/200	BD 563256
CD56	APC	IgG1, κ	6,25µg/ml	1/20	BD 555518	CD56	APC	IgG1, κ	6,25µg/ml	1/20	BD 555518
CD94	PE	IgG1, κ	100µg/mL	1/20	BD 555889	CD94	PE	IgG1, κ	100µg/mL	1/20	BD 555889
NKG2A	FITC	IgG2a	200µg/ml	1/20	Miltenyi 130-113-565	NKG2A	VioBright-FITC	REA	33µg/ml	1/50	Miltenyi 130-114-094
TCRαβ	BB700	IgG1, κ	200µg/ml	1/40	BD 745983	NKG2C	BV786	IgG1, κ	200µg/mL	1/200	BD 748170
TCRγδ	BV650	IgG1, κ	200µg/ml	1/40	BD 564156	TCRαβ	BB700	IgG1, κ	200µg/ml	1/160	BD 745983
TCRα24	BV711	IgG1, κ	50µg/ml	1/40	BD 563268	TCRγδ	BV421	IgG1, κ	200µg/ml	1/50	BD 562560
						TCRα24	BV711	IgG1, κ	50µg/ml	1/40	BD 563268

Puis, après 3 lavages dans du PBS / BSA (sérum albumine bovine) 0.01%, les cellules sont reprises dans 150ml de PBS, transférées dans des tubes de cytométrie et passées au cytomètre BD LSR-Fortessa X-20 sur la plateforme Cytocell (SFR Bonamy, Nantes). L'analyse des données obtenues est effectuée avec le logiciel BD FACSDiva. La stratégie de «gating» utilisée, ainsi que la hiérarchisation permettant de caractériser les sous-populations d'intérêt sont mentionnées dans la Figure 17. Brièvement, les cellules viables (FVS négatives, excluant le marqueur de viabilité) présentes dans la fenêtre contenant les lymphocytes, sont acquises (au moins 20 000 cellules

viables). Puis les populations suivantes sont recherchées : 1) lymphocytes T CD3+ ainsi que leurs sous-populations CD4/CD8 et TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$, 2) cellules CD94/NKG2A et 3) cellules NK (CD3-CD56+) et iNKT [une sous-population de lymphocytes T innés appelés NKT, présents dans les tumeurs, qui possèdent une chaîne alpha du récepteur TCR invariante (TCR α 24)].

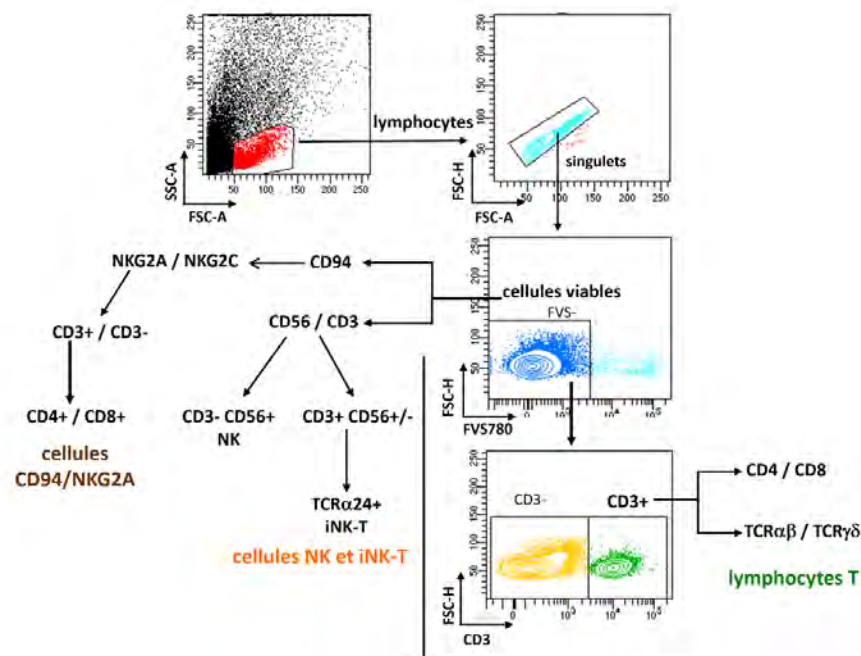


Figure 19: Stratégie de hiérarchisation utilisée en cytométrie pour caractériser et quantifier les lymphocytes T, les cellules CD94/NKG2A et les cellules NK / iNK-T

VIII. Analyses statistiques

L'ensemble des données anatomo-cliniques, immunohistochimiques et moléculaires a été incrémenté dans une base de données codées et sécurisées en accord avec les recommandations de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés).

Les variables qualitatives sont présentées selon les effectifs et pourcentages et les variables quantitatives selon les moyennes, minimums et maximums.

Les relations entre les caractéristiques cliniques, morphologiques et phénotypiques ont été analysées à l'aide d'un test de Fisher (l'effectif limité ne permettant pas d'utiliser un test du Chi²) et à l'aide d'un test de Kruskal Wallis. D'autre part, les corrélations entre les densités en cellules immunitaires et les variables quantitatives ont été réalisées à l'aide d'un test de Spearman.

Enfin, les courbes de survie ont été construites selon la méthode de Kaplan-Meier et le test du log rank a été utilisé pour comparer les différents groupes.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du site en ligne « pvalue.io » utilisant le logiciel statistique R.

Un $p < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif, soit un seuil de significativité fixé à 5%.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du site en ligne « pvalue.io » utilisant le logiciel statistique R.

IX. Ethique et financement

Tous les patients inclus ont signé un consentement à l'utilisation de leurs prélèvements à des visées de recherche.

Cette étude a bénéficié d'une bourse de recherche allouée par le pôle de biologie PHU7 du CHU de Nantes.

Résultats

I. Caractéristiques anatomo-cliniques des patients inclus dans la cohorte

Les caractéristiques cliniques et morphologiques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 8: Caractéristiques cliniques et morphologiques de la cohorte

	Total (n=42)
Age au diagnostic , en année – moyenne	62,4 [55,1 ; 69,7]
Sexe :	
• Femme – n (%)	18 (43)
• Homme – n (%)	24 (57)
Tabac :	
• Consommation – n (%)	37 (88)
• Quantité (en P-A) - moyenne	46,9 [30,0 ; 58,8]
• Sevrage – n (%)	23 (62)
Antécédents pneumologiques - n-(%) -	15 (36)
• BPCO - n (%)	9 (60)
• Emphysème - n (%)	2 (13,4)
• Pneumothorax - n (%)	1 (6,7)
• Asthme - n (%)	2 (13,4)
• Exposition à l’amiante - n (%)	1 (6,7)
Antécédents carcinologiques - n (%)	
• Aucun	25(60)
• Au moins un antécédent	17(40)
Symptômes au diagnostic :	
• Présent - n (%)	21 (50)
• Absent - n (%)	21(50)
Mode de diagnostic :	
• Examen extemporané - n (%)	14 (33,3)
• Ponction sous scanner - n (%)	14 (33,3)
• Fibroscopie bronchique - n (%)	5 (12)
• Diagnostic sur pièce - n (%)	4 (9,4)
• Non connu - n (%)	5 (12)
Type histologique :	
• Carcinome épidermoïde - n (%)	11 (26)
• Adénocarcinome - n (%)	31 (74)
Sous-type histologique :	
• Carcinome épidermoïde (n=11)	
○ Non kératinisant - n (%)	7 (63,6)
○ Kératinisant- n (%)	4 (36,4)
• Adénocarcinome (n=31)	
○ Lépidique - n (%)	9 (29)
○ Acineux - n (%)	16 (51,6)
○ Solide - n (%)	4 (12,9)
○ Mucineux - n (%)	1 (3,2)
○ AIM - n (%)	1 (3,2)
Adénocarcinome (n=31) :	

• Mucosécrétion - n (%)	6 (19,4)
• Adénocarcinome TTF1+ - n (%)	26 (84)
• Contingent micropapillaire - n (%)	3 (9,7)
• Mutation EGFR :	
○ Muté - n (%)	2 (6,3)
○ Non muté - n (%)	25 (78,1)
○ Non connu - n (%)	5 (15,6)
Thrombose :	
• Absente - n (%)	27 (64)
• Présente - n (%)	15 (36)
Embole :	
• Absent - n (%)	35 (83)
• Présent - n (%)	7 (17)
Taille, en mm - moyenne [min ; max]	35,5 [17,2 ; 45]
Stade pT :	
• 1a - n (%)	1 (2,4)
• 1b - n (%)	7 (16,7)
• 1c - n (%)	6 (14,3)
• 2a - n (%)	14 (33,3)
• 2b - n (%)	3(7,1)
• 3 - n (%)	5 (11,9)
• 4 - n (%)	6 (14,3)
Stade pN :	
• 1 - n (%)	6 (14,5)
• 2 - n (%)	9 (21,3)
• Non connu - n (%)	1 (2,2)
Stade :	
• IA1 - n (%)	1 (2,4)
• IA2 - n (%)	6 (14)
• IA3 - n (%)	3 (7,1)
• IB - n (%)	8 (19)
• IIA - n (%)	3 (7,1)
• IIB - n (%)	8 (19)
• IIIA - n (%)	8 (19)
• IIIB - n (%)	5(12)
Chimiothérapie post-opératoire :	
• Oui - n (%)	19 (45,2)
• Non - n (%)	22(52,4)
• Statut non connu - n (%)	1 (2,4)
Survie :	
• Rechute à 5 ans :	
○ Oui - n (%)	22 (52,4)
○ Non - n (%)	5 (11,9)
○ Statut non connu - n (%)	15 (35,7)
• Décès à 5 ans :	
○ Oui - n (%)	22 (52,4)
○ Non - n (%)	20 (47,6)
• Survie moyenne sans progression (en mois) [min; max]	32,2 [4,3 ; 60]
• Survie moyenne globale à 5 ans	45,9 [7 ; 60]

Les données descriptives de la cohorte nous permettent de distinguer qu'il s'agit majoritairement d'hommes, d'âge moyen 62 ans au diagnostic, tabagiques, le plus souvent sevrés. Ils présentent des antécédents non négligeables : 36% d'entre eux présentent un antécédent pneumologique dont le plus fréquent est la BPCO et 40% d'entre eux présentent un antécédent carcinologique (considéré comme en rémission au diagnostic du CPNPC). Le diagnostic a été établi préférentiellement à partir d'un prélèvement préopératoire ou peropératoire (biopsie sous scanner ou examen extemporané). Il s'agit le plus souvent d'adénocarcinome TTF1+, de sous-type histologique acineux sans mucosécrétion réalisant des lésions majoritairement au moins pT2, le plus souvent sans métastase ganglionnaire retrouvée au curage hilair et médiastinal. Un des patients de la cohorte n'a pas bénéficié de curage ganglionnaire. Seuls 36% des tumeurs présentent des thromboses visibles et 17% d'entre elles réalisent des embolies tumorales. 46% des patients ont bénéficié d'une chimiothérapie post-opératoire et 38,1 % ont présenté une rechute dans les 5 ans suivant la chirurgie. La survie moyenne sans progression est de 32,2 mois (survie médiane sans progression de 21 mois) tandis que la survie globale à 5 ans est de 45,9 mois (avec une médiane de 60 mois).

II. Profil d'expression tissulaire des ligands HLA-E/ β 2m et PDL1

II.1 Profil d'expression du ligand HLA-E/ β 2m dans le tissu pulmonaire normal

Les cellules de l'épithélium bronchique et les pneumocytes expriment peu ou pas l'HLA-E : 57,1% présentent un score 1 tandis que 42,9% d'entre eux présentent un score 0. Elles n'expriment pas la β 2m.

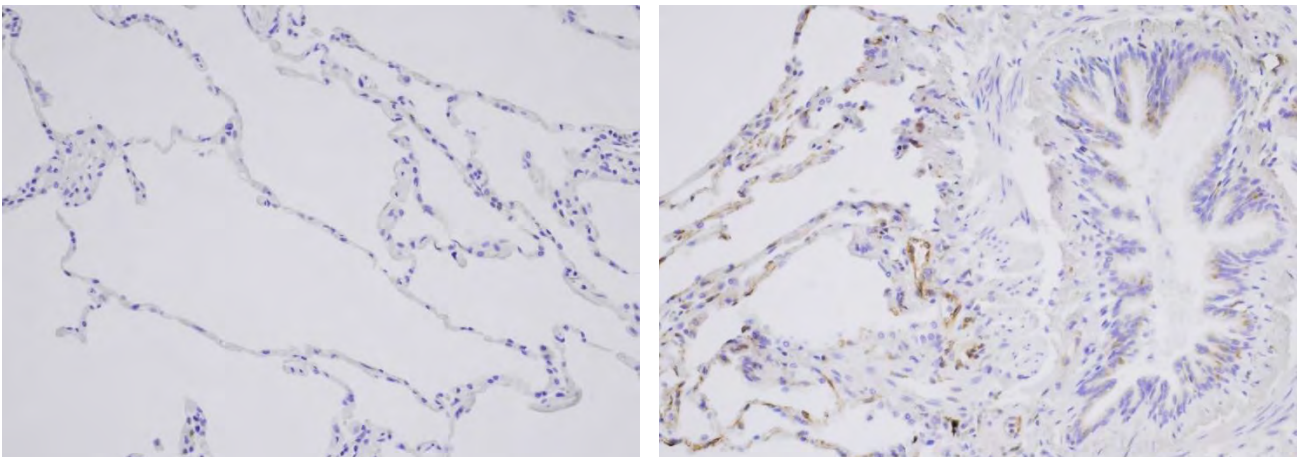


Figure 20: exemples de deux cas présentant un score HLA-E 0 (à gauche) et un score HLA-E 1+ (à droite) au niveau du tissu pulmonaire normal. Grossissement x20. Lames d'immunohistochimie avec l'anticorps anti-HLA-E.

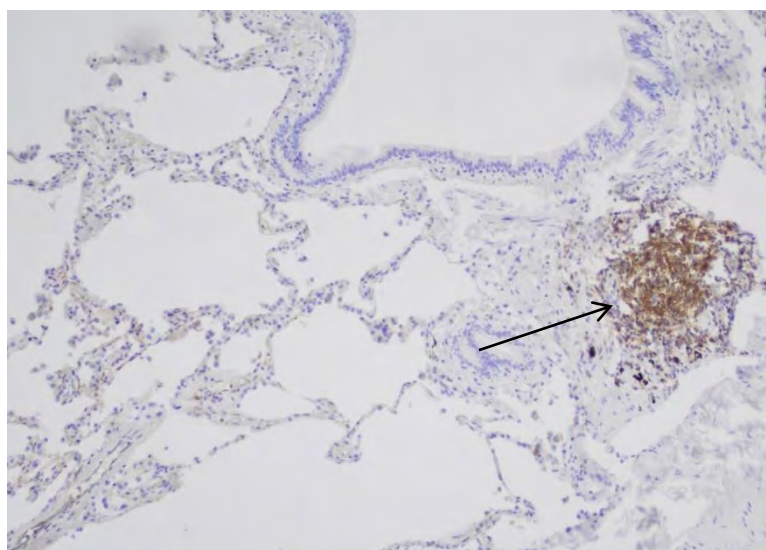


Figure 21: exemple d'un cas présentant un score β 2-microglobuline 0 au niveau du tissu pulmonaire normal. Grossissement x20. Lame d'immunohistochimie avec l'anticorps anti- β 2microglobuline. NB : la flèche correspond à un follicule lymphoïde (témoin interne)

II.2 Profil d'expression des ligands HLA-E/ β 2m et PDL1 dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules en fonction des caractéristiques anatomo-cliniques

II.2.1 Profil d'expression des ligands HLA-E/ β 2m et PDL1

Dans cette cohorte de 42 tumeurs, 26,2% (11/42) des tumeurs surexpriment l'HLA-E et 35,7% (15/42) surexpriment la β 2m + par les cellules tumorales. Si on considère l'expression conjointe d'HLA-E et de la β 2m +, seules 5 (soit 11.9%) tumeurs surexpriment le ligand HLA-E/ β 2m + par rapport au tissu sain apparié.

Tableau 9: Expression de la β 2microglobuline et de l'HLA-E dans la cohorte

	β 2m -	β 2m +	Total
HLAE-	21 (50%)	10 (23,8%)	31 (73.8%)
HLAE+	6 (14.3%)	5 (11,9%)	11 (26.2%)
Total	27 (64,3%)	15 (35,7%)	42

Concernant l'expression du ligand PDL1, 10 tumeurs (soit 23.8%) présentant une surexpression du ligand PDL1.

Tableau 10: expression du PD-L1 dans la cohorte

Expression du ligand PDL1	PDL1+	PDL1-	Total
Tumeurs	10 (23,8%)	32 (76.8%)	42

Une co-expression des ligands HLA-E/ β 2m était noté dans 4 tumeurs soit 9,5 % des tumeurs.

Tableau 11: co-expression des ligands HLA-E/ β 2m et PD-L1 dans la cohorte

Expression des ligands HLA-E/ β 2m + et PDL1	Tumeurs
HLA-E/ β 2m +	5 (11,9%)
PDL1+	10 (23,8%)
HLA-E/ β 2m + et PDL1+	4 (9,5%)

II.2.2 Corrélation avec les caractéristiques anatomo-cliniques

Tableau 12: Corrélation de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m avec les caractéristiques cliniques et morphologiques

	Non ou simple expresseur HLA-E/ β 2m (n = 37)	Double expresseur HLA-E/ β 2m (n = 5)	p
Age au diagnostic , en année – médiane [min ; max]	62,2 [54,9; 69,0]	63,2 [55.8; 73.2]	0,64
Sexe :			1
• Femme – n (%)	16 (43)	2 (40)	
• Homme – n (%)	21 (57)	3 (60)	
Tabac :			0,49
• Tabac			
○ Oui – n (%)	33 (89)	4 (80)	
○ Non – n (%)	4 (11)	1 (20)	
• Quantité (en P-A) - moyenne	48,8 (\pm 33,2)	35,0 (\pm 9,13)	0,52
• Sevrage			0,14
○ Oui – n (%)	22 (67)	1 (25)	
○ Non – n (%)	11 (33)	3 (75)	
Antécédents pneumologiques :			1
• Absent - n-(%)	24 (65)	3 (60)	
• Présent - n-(%) -	13 (35)	2 (40)	
Antécédents carcinologiques :			0,63
• Aucun - n (%)	21 (57)	4 (80)	
• Au moins un antécédent - n (%)	16 (43)	1 (20)	
Type histologique :			1
• Adénocarcinome - n (%)	27 (73)	4 (80)	
• Carcinome épidermoïde - n (%)	10 (27)	1 (20)	
Sous-type histologique :			0,96
• Carcinome épidermoïde (n=11)			
○ Non kératinisant - n (%)	6 (16)	1 (20)	
○ Kératinisant- n (%)	4 (11)	0 (0)	
• Adénocarcinome (n=31)			
○ Lépidoïque - n (%)	8 (22)	1 (20)	
○ Acineux - n (%)	14 (38)	2 (40)	
○ Solide - n (%)	3 (8,1)	1 (20)	
○ Mucineux - n (%)	1 (2,7)	0 (0)	
○ AIM - n (%)	1 (2,7)	0 (0)	

Adénocarcinome (n=31) :			
• Mucosécrétion :			
○ Non - n (%)	21 (78)	4 (100)	0,56
○ Oui - n (%)	6 (16)	0 (0)	
• Adénocarcinome TTF1+ :			
○ Non - n (%)	4 (15)	1 (25)	0,52
○ Oui - n (%)	23 (85)	3 (75)	
• Contingent micropapillaire :			
○ Non - n (%)	25 (93)	3 (75)	0,35
○ Oui - n (%)	2 (7,4)	1 (25)	
• Mutation EGFR :			
○ Non muté - n (%)	22 (83)	3 (100)	1
○ Muté - n (%)	2 (8,3)	0 (0)	
Thrombose :			
• Absente - n (%)	25 (68)	2 (40)	0,33
• Présente - n (%)	12 (32)	3 (60)	
Embole :			
• Absent - n (%)	30 (81)	5 (100)	0,57
• Présent - n (%)	7 (19)	0 (0)	
Taille, en mm - moyenne [min ; max]	25,0 [15,0; 45,0]	40.0 [24,0; 42,0]	0,34
Statut PD-L1 :			
• Négatif - n (%)	31 (84)	1 (20)	<0,01
• Positif - n (%)	6 (16)	4 (80)	
Score TPS PD-L1, en %, moyenne	5,95	22,5	<0,01
Stade pT :			0,15
• 1a - n (%)	1 (2,7)	0 (0)	
• 1b - n (%)	7 (19)	0 (0)	
• 1c - n (%)	6 (16)	0 (0)	
• 2a - n (%)	12 (32)	2 (40)	
• 2b - n (%)	1 (2,7)	2 (40)	
• 3 - n (%)	5 (14)	0 (0)	
• 4 - n (%)	5 (14)	1 (20)	
Stade pN :			
• 0 - n (%)	23 (64)	3 (60)	0,15
• 1 - n (%)	4 (11)	2 (40)	
• 2 - n (%)	9 (25)	0 (0)	
Stade :			
• IA1 - n (%)	1 (2,7)	0 (0)	0,75
• IA2 - n (%)	6 (16)	0 (0)	
• IA3 - n (%)	3 (8,1)	0 (0)	
• IB - n (%)	7 (19)	1 (20)	
• IIA - n (%)	2 (5,4)	1 (20)	
• IIB - n (%)	6 (16)	2 (40)	
• IIIA - n (%)	7 (19)	1 (20)	
• IIIB - n (%)	5 (14)	0 (0)	

D'un point de vue clinique, les patients atteints d'un CPNPC présentant une surexpression du ligand HLA-E/ β 2m correspondaient principalement à des patients masculins (60% d'hommes, d'âge moyen 63,2 ans), le plus souvent sans antécédent carcinologique ou pneumologique. Ce sont

majoritairement des patients tabagiques (80%) sevrés, avec une consommation moyenne estimée à 35 P-A.

D'un point de vue morphologique, les tumeurs HLA-E/ β 2m correspondent majoritairement à adénocarcinomes TTF1+ de type acineux et de stade au moins pT2a, avec une taille tumorale médiane de 40 mm. En raison du nombre restreint de tumeurs HLA-E/ β 2m, la portée et la pertinence de l'analyse statistique entre les deux groupes sont limitées.

D'un point de vue phénotypique, la majorité des tumeurs HLA-E/ β 2m + expriment aussi PDL1 : on note une surexpression du ligand PDL1 dans les CPNPC HLA-E/ β 2m + : 4 patients (80%) HLA-E/ β 2m+ présentent une surexpression de PDL1 avec un TPS moyen de 22.5% contre 6 patients (16%) avec un TPS moyen de 5,95%.

III. Caractérisation des cellules immunitaires dans les carcinomes non à petites cellules

III.1 Densité des cellules immunitaires intra-épithéliales dans les CPNPC en immunohistochimie

Dans les carcinomes pulmonaires, nous avons noté une densité élevée en lymphocytes CD3+ intra-épithéliaux, et notamment au niveau du front d'invasion où la densité en lymphocytes CD3+ est plus importante que dans le tissu tumoral au centre de la tumeur (densité moyenne de 0,0934 au niveau du front d'invasion vs 0,0495 au niveau du centre tumoral). La même tendance est notée pour les lymphocytes T CD8+ et pour les lymphocytes NKG2A (cf tableau 13).

A l'inverse, on note une densité plus élevée en lymphocytes NKP46+ au centre tumoral qu'au niveau du front d'invasion.

Ces résultats montrent qu'il existe d'avantage de lymphocytes T CD3+ au niveau du front d'invasion qu'au centre de la tumeur et qu'il existe une corrélation monotone croissante entre ces deux variables. Ce profil est également applicable aux lymphocytes T CD8+.

D'autre part, la densité des cellules NK NKP46+ est beaucoup moins importante par rapport à celle des lymphocytes T CD3+ et CD8+ tant au niveau du front tumoral qu'au centre de la tumeur et il n'existe pas de corrélation statistiquement significative entre ces éléments.

Enfin, la densité de cellules NKG2A+ est très faible par rapport à celles des cellules NK NKP46+ et des lymphocytes T CD3+ et CD8+.

Tableau 13: densité en cellules immunitaires intra-épithéliales (IEL) dans la cohorte

Nombre de cellules immunitaires / nombre de cellules tumorales sur 1mm ²	Médiane (minimum ; maximum)	Coefficient de corrélation, P value et test
CD 3 :		
• centre tumoral	0.034,7 [0.0186; 0.0602]	0.756 ; <0.001, test de Spearman
• front d'invasion	0.0553 [0.0283; 0.107]	
CD8 :		
• centre tumoral	0.0243 [0.0153; 0.0556]	0.789 ; <0.001, test de Spearman
• front d'invasion	0.0457 [0.0199; 0.0695]	
NKP46		
• centre tumoral	0.00555 [0.00287; 0.0117]	0.583 ; <0.001, test de Spearman
• front d'invasion	0.00483 [0.00258; 0.00840]	
NKG2A :		
• centre tumoral	0,000910 [0.000367; 0.00222]	0.649 ; <0.001, test de Spearman
• front d'invasion	0.00260 [0.000936; 0.00546]	

III.2 Corrélation entre la densité en cellules immunitaires et les caractéristiques cliniques

Les relations entre les densités en cellules immunitaires avec les 4 marqueurs et les caractéristiques cliniques sont présentées dans le tableau suivant.

• N0	0,054 [0,001- 0,635]	0,34	0,040 [0- 0,354]	0,8	0,007 [0,001 – 0,025]	0,17	0,002 [0- 0,033]	0,57
• N+	0,035 [0,0042- 0,101]		0,038 [0,002- 0,075]		0,004 [0,001 – 0,045]		0,002 [0 – 0,012]	
Mutation EGFR								
• EGFR muté	0,332 [0,030- 0,635]	0,46	0,188 [0,021 - 0,354]	0,41	0,008 [0,001 – 0,016]	0,89	0,017 [0,001- 0,033]	0,55
• EGFR non muté	0,057 [0,004- 0,163]		0,039 [0,002 - 0,142]		0,005 [0,001 – 0,025]		0,002 [0- 0,026]	
Statut HLA-E/β2m								
• Négatif	0,042 [0,001- 0,635]	0,19	0,038 [0- 0,354]	0,08	0,005 [0,001 – 0,045]	0,34	0,002 [0- 0,033]	0,17
• Positif	0,097 [0,023- 0,163]		0,058 [0,034- 0,130]		0,007 [0,003 – 0,025]		0,004 [0,001 – 0,021]	
Statut PDL1								
• Négatif	0,040 [0,001- 0,164]	0,1	0,036 [0,0003- 0,143]	0,12	0,005 [0,001- 0,043]	0,1	0,002 [0- 0,026]	0,19
• Positif	0,088 [0,007- 0,635]		0,045 [0,007- 0,354]		0,011 [0,001- 0,045]	-	0,003 [0,001- 0,033]	
Double expresseur HLA-E/β2m et PDL1+								
• Négatif	0,040 [0,001- 0,635]	0,04	0,038 [0- 0,354]	0,13	0,005 [0,001- 0,045]	0,11	0,002 [0 – 0,033]	0,19
• Positif	0,116 [0,045- 0,163]		0,076 [0,034- 0,130]		0,011 [0,006- 0,025]	-	0,004 [0,001 – 0,021]	

Pour les analyses de corrélation entre la densité des cellules immunitaires et les caractéristiques cliniques, nous avons regroupés les densités en cellules immunitaires du front et du front tumoral pour les quatre marqueurs (la moyenne entre les deux densités pour chaque marqueur a été utilisée).

D'un point de vue clinique, ces résultats ne mettent pas en évidence de corrélation significative entre la densité des cellules immunitaires CD, CD8, NKp46 et NKG2A et l'âge, le sexe et le statut tabagique. Néanmoins, la densité de cellules immunitaires CD8⁺ est corrélée de façon significative à la quantité de tabac consommée.

D'un point de vue morphologique, la densité des cellules immunitaires CD3 ; CD8 ; NKp46 ou NKG2A n'est pas significativement différente selon le type histologique. Seule la densité en cellules immunitaires CD3⁺ est plus élevée dans les adénocarcinomes de type solide. De même, la densité des cellules immunitaires n'est pas statistiquement significative selon la taille tumorale, le statut ganglionnaire, le stade et la présence d'une mutation EGFR.

Enfin, ces résultats montrent que l'infiltrat immunitaire en cellules CD3⁺ est plus dense dans les tumeurs HLA-E/ β 2m⁺ et PDL1⁺ que les tumeurs simples ou non expresseurs de ces deux ligands.

III.3 Caractérisation des cellules immunitaires intratumorales en cytométrie en flux

Pour ces analyses, nous avons pris en comptes les cellules immunitaires intratumorales intra-épithéliales et stromales (contrairement aux analyses immunohistochimiques où seules les TIL intra-épithéliaux étaient comptés).

Afin de préciser le phénotype des TIL, des expériences préliminaires de cytométrie en flux ont été réalisées sur des tumeurs congelées de 6 patients, en utilisant 2 multimarquages (MM) complémentaires (MM1 en bleu et MM2 en jaune dans les tableaux ci-dessous). La congélation de la tumeur, nécessaire car il était difficile de procéder à toutes les étapes de dissociation / marquage / acquisition en cytométrie à la réception des échantillons frais, n'altère pas la viabilité des TIL. En effet, comme le montre le tableau de la Figure 20, en moyenne 85% des cellules présentes dans la fenêtre contenant les cellules lymphoïdes sont viables (cellules non marquées par le marqueur de viabilité FVS). Le MM2, plus complet car permettant de quantifier des sous-populations CD4/CD8 parmi lymphocytes T, ainsi que les cellules NKG2A/NKG2C parmi les CD94⁺, récemment mis au point avec l'aide de la plateforme Cytocell, n'a pu être réalisé que sur 3 tumeurs, dont une (P5) a été très difficile à analyser en raison du faible nombre de TIL viables présents dans la fenêtre des cellules lymphoïdes.

La proportion et le phénotype des sous-populations suivantes ont été recherchés : lymphocytes T, cellules CD94/NKG2A, cellules NK/iNK-T et sont détaillés successivement.

Lymphocytes T : ces expériences préliminaires montrent la présence de lymphocytes T CD3+ dans les tumeurs du poumon, de phénotype à la fois CD4+ (environ 50% en moyenne, n=3) et CD8+ (environ 40%) (valeur de p non significative dans ces expériences préliminaires). De plus, la grande majorité des lymphocytes T CD3+ expriment le récepteur TCR $\alpha\beta$ (94% en moyenne, n=6) ; très peu expriment le TCR $\gamma\delta$ 2.3%) (Figure 20). Il en est de même pour les sous-populations CD4 et CD8. Il existe également 2 sous-populations minoritaires de lymphocytes T CD3+ double positives CD4+ CD8+ et double négatives CD4- CD8- (Figure ...), ces dernières exprimant préférentiellement le TCR $\alpha\beta$ lorsqu'il est présent (observé sur P6).

patient	% cellules viables dans fenêtre lymphocytes	% CD3- parmi les cellules viables	% CD3+ parmi les cellules viables	% CD4+ parmi les CD3+	% CD8+ parmi les CD3+	DP CD4+CD8+	DN CD4-CD8-	% cellules TCR $\alpha\beta$ + parmi les CD3+	% cellules TCR $\gamma\delta$ + parmi les CD3+
P1	76,2	38,9	61,1	ND	ND	ND	ND	84,5	7,3
P2	86,4	41,8	58,2	ND	ND	ND	ND	94,5	1,9
P3	98	20,4	79,6	ND	ND	ND	ND	96,7	0,3
P4	98	72	28	59,3	32,1	3,3	5,3	98,7	0,2
P5 *	70	52	48	44	36				
P6	83,5	22	78	46,4	48,8	3,1	1,7	96,9	1,9
moyenne (%)	85,4	41,2	58,8	49,9	39,0	3,2	3,5	94,3	2,3
sem	1,89	7,90	7,90	4,75	5,04			2,53	1,30

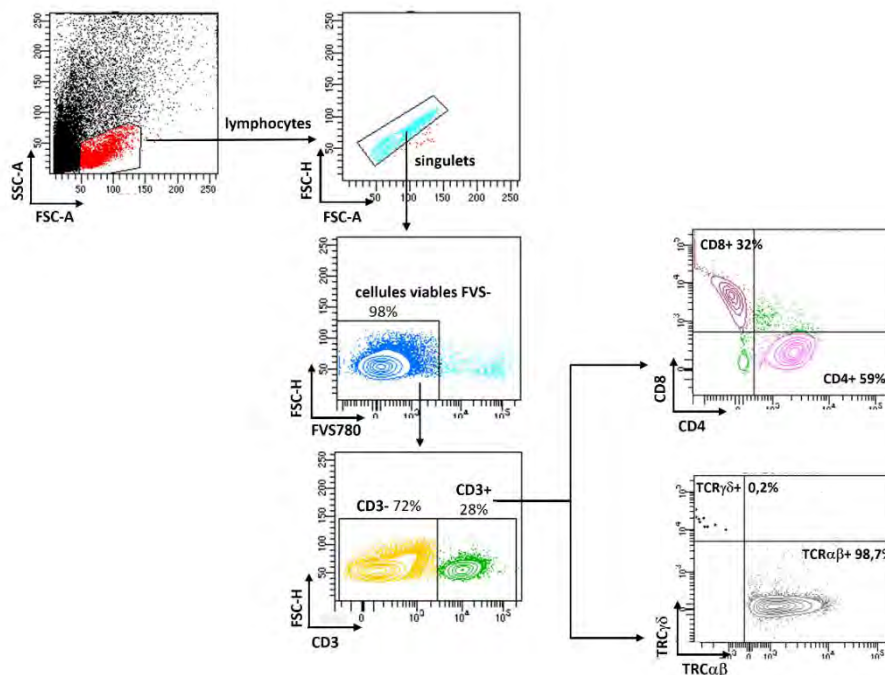


Figure 22 : Analyse des sous-populations de lymphocytes T dans les tumeurs du poumon non à petites cellules par cytométrie en flux. Tableau récapitulatif de toutes les tumeurs étudiées et cytogrammes d'un exemple représentatif : tumeur du patient P4. P5* : tumeur qui contenait peu de cellules lymphoïdes ; certaines sous-populations n'ont pu être correctement analysées dans cette tumeur du fait du faible nombre de TIL au départ. ND : non déterminé

Cellules CD94/NKG2A : Comme le montre la Figure 21, les cellules CD94+ représentent environ 8% (3,5 à 12%, n=5) des cellules lymphoïdes de la tumeur. Ces cellules expriment en grande majorité le récepteur inhibiteur NKG2A (environ 90% des cellules CD94+ sont NKG2A+). Environ 1/3 de ces cellules CD94+ NKG2A+ sont des lymphocytes T CD3+, qui sont presque exclusivement de phénotype cytotoxique CD8+ (Figure 21).

patient	% CD94+ parmi les cellules viables	% NKG2A+ parmi les CD94+	% NKG2C+ parmi les CD94+	parmi les cellules CD94+ NKG2A+		parmi les cellules CD94+ NKG2A+ CD3+	
				%CD3-	% CD3+	%CD4+	%CD8+
P1	7,4	89,3	ND	47,2	52,1	ND	
P2	7,3	86	ND	60,8	39,2	ND	
P3	11,8	76	ND	71,6	28,4	ND	
P4	3,5	95	0	75	25	0	92,9
P5 *							
P6	9,3	91,5	6,4	79,4	20,5	0,4	91,3
moyenne (%)	7,9	87,6	3,2	66,8	33	0,2	92,1
<i>sem</i>	1,36	3,24		5,78	5,68		

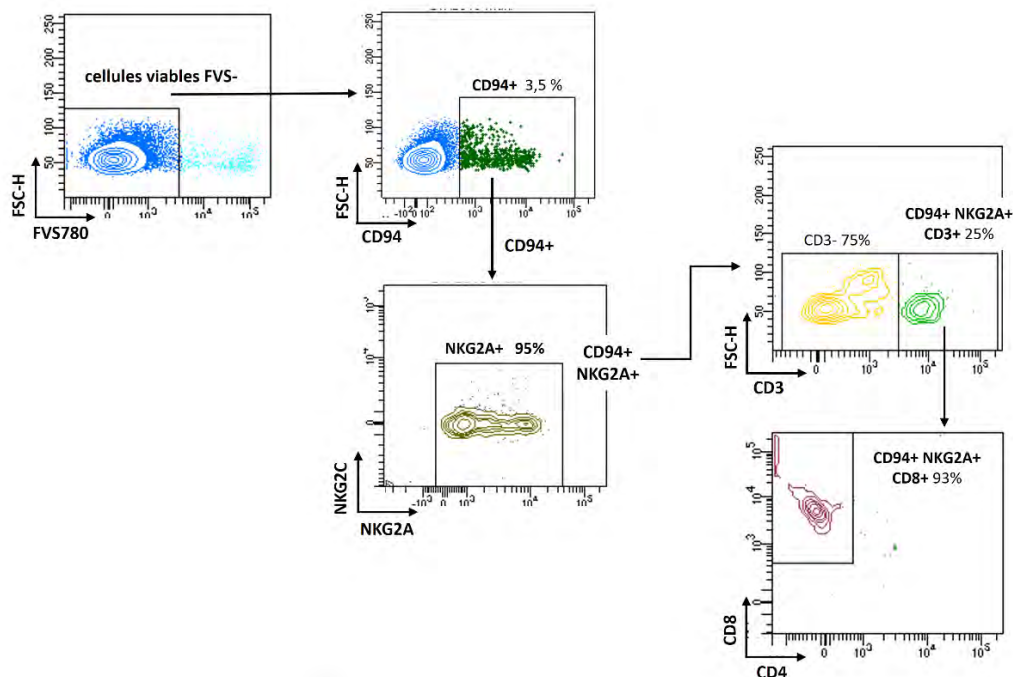


Figure 23 : Mise en évidence des cellules CD94/NKG2A dans les tumeurs du poumon non à petites cellules par cytométrie en flux. Tableau récapitulatif de toutes les tumeurs étudiées et cytogrammes d'un exemple représentatif : tumeur du patient P4. P5* : tumeur qui contenait peu de cellules lymphoïdes ; les cellules CD94/NKG2A n'ont pu être analysées dans cette tumeur du fait du faible nombre de TIL au départ. ND : non déterminé

Cellules NK et iNK-T : Comme mentionné dans la Figure 22, les cellules NK de phénotype CD3-CD56+ représentent une sous-population minoritaire dans le cancer du poumon non à petites cellules (3% en moyenne, 2,4 à 4%, n=5). La sous-populations de lymphocytes T de type NK (NK T) de type I, appelés iNKT car ils expriment une chaîne invariante du TCR alpha mise en évidence avec l'anticorps anti-TCR α 24, est faiblement représentée dans les tumeurs étudiées (1.3% en moyenne, 0.6 à 3.4%, n=5) (Figure 22).

patient	% NK CD3- CD56+ parmi les cellules viables	% iNK-T TCR α 24+ parmi les CD3+ CD56+/-
P1	4,1	0,7
P2	2,6	0,2
P3	3,3	0,6
P4	2,4	1,4
P5 *		
P6	3,1	3,4
moyenne (%)	3,1	1,3
<i>sem</i>	0,30	0,57

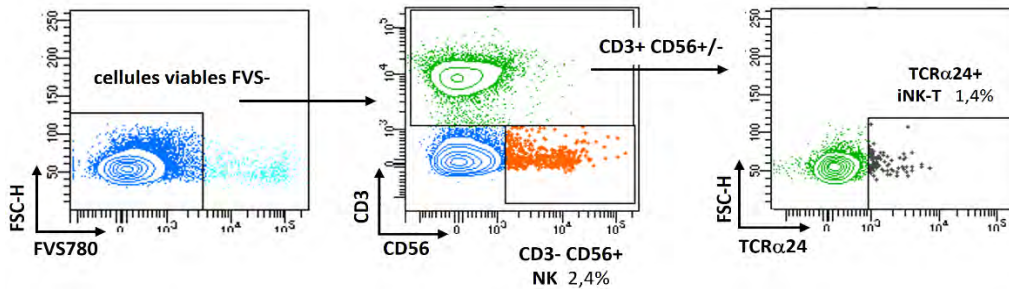


Figure 24 : Cellules NK et iNK-T dans les tumeurs du poumon non à petites cellules par cytométrie en flux. Tableau récapitulatif de toutes les tumeurs étudiées et cytogrammes d'un exemple représentatif : tumeur du patient P4. P5* : tumeur qui contenait peu de cellules lymphoïdes ; les cellules NK et NK-T n'ont pu être analysées dans cette tumeur du fait du faible nombre de TIL au départ. ND : non déterminé

Nous avons également recherché la proportion de cellules exprimant le récepteur CD94/NKG2A parmi les cellules NK / iNK-T en comparaison avec les lymphocytes T conventionnels CD3+. Comme la Figure 23 le montre, les cellules CD94+ NKG2A+, minoritaires dans les lymphocytes T CD3+ sont prépondérantes dans la population de cellules NK (moyenne 53%, n=5). Environ 25% des iNK-T sont CD94+ NKG2A+ sur les 2 tumeurs analysables contenant suffisamment de cellules iNKT (>1% P4 et P6)).

patient	% de cellules lymphocytes T CD3+	CD94+ NKG2A+ parmi les cellules NK CD3- CD56+	CD94+ NKG2A+ parmi les cellules iNK-T CD3+ CD56+/- TCR α 24+
P1	1,7	51,1	**
P2	4,2	57,9	**
P3	8	68,9	**
P4	2	49,1	31,6
P5*			
P6	7,8	36,4	16,7
moyenne (%)	4,7	52,7	24,2
<i>sem</i>	1,36	5,34	

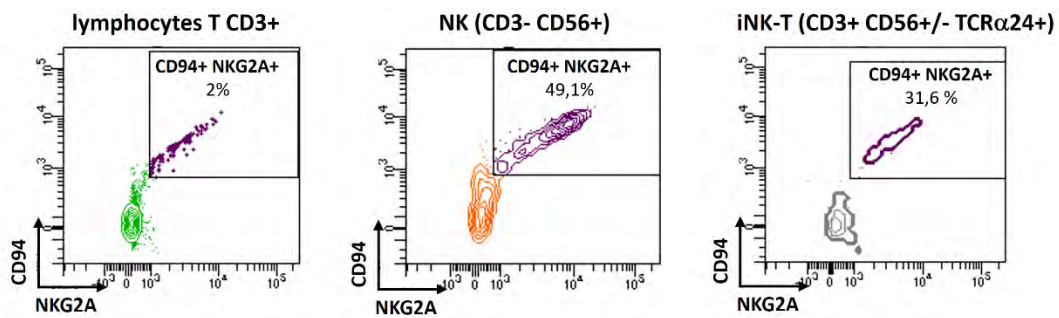


Figure 25 : Proportion de cellules exprimant le récepteur CD94/NKG2A parmi les lymphocytes T, les cellules NK et iNK-T dans les tumeurs du poumon non à petites cellules par cytométrie en flux. Tableau récapitulatif de toutes les tumeurs étudiées et cytogrammes d'un exemple représentatif : tumeur du patient P4. P5* : tumeur qui contenait peu de cellules lymphoïdes donc pas analysable du fait du faible nombre de TIL au départ. ** : % de cellules iNKT trop faible (<1%) pour évaluer les double positifs CD94+ NKG2A+.

IV. Influence pronostique des marqueurs de l'immunité anti-tumorale et de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m

IV.1 Survie globale des patients inclus

Le taux de survie sans progression à 5 ans est de 18.5% avec une médiane à 21 mois et le taux de survie à 5 ans est de 47.6% avec une médiane à 60 mois.

Tableau 15: Survie sans progression et globale à 5 ans des patients inclus dans la cohorte.

	Médiane [min ; max]	Taux de survie (IC 95%)
Survie sans progression à 5 ans (en mois)	21 [4,3 ; 60]	18,5% (8,38% ; 40,9%)
Survie globale à 5 ans (en mois)	60 [7 ; 60]	47,6% (34,7% ; 65,4%)

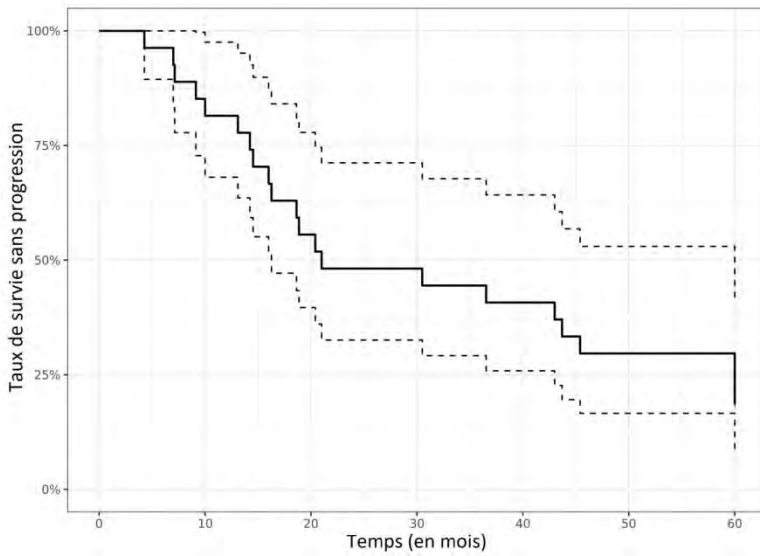


Figure 26: Survie sans progression à 5 ans dans la cohorte

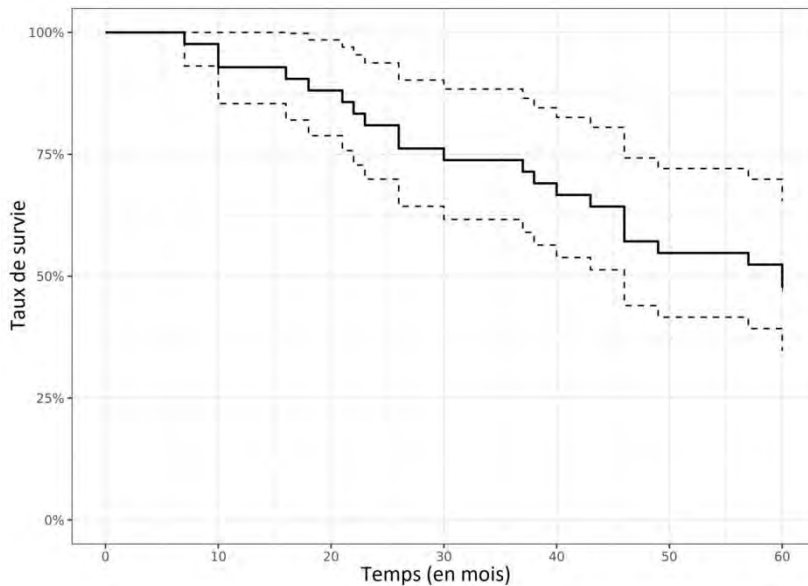


Figure 27: Survie globale à 5 ans dans la cohorte

IV.2 Survie en fonction de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m et du PDL1

IV.2.1 Survie en fonction de l'expression du ligand HLA-E/ β 2m

En comparant les patients exprimant le ligand HLA-E/ β 2m et ceux sans expression, on ne trouve pas de différence significative tant en terme de survie sans progression que de survie globale (tableau 16).

Tableau 16: Comparaison de la survie sans progression et de la survie globale à 5 ans chez les patients HLA-E/ β 2m + et HLA-E/ β 2m-.

Survie sans progression à 5 ans					
		Médiane (IC 95%)	Taux de survie (IC 95%)	p	test
HLA-E/ β 2m	Négatif	30,5 (4,3; 60)	17,4% (7,14%; 42,4%)	0,65	Logrank
	Positif	13,1 (9,1; 60)	25,0% (4,58%; 100,0%)	-	-
Survie globale à 5 ans					
HLA-E/ β 2m	Négatif	60 (7 ; 60)	48,6% (34,9% ; 67,7%)	0,43	Logrank
	Positif	26 (10 ; 60)	40,0% (13,7% ; 100,0%)	-	-

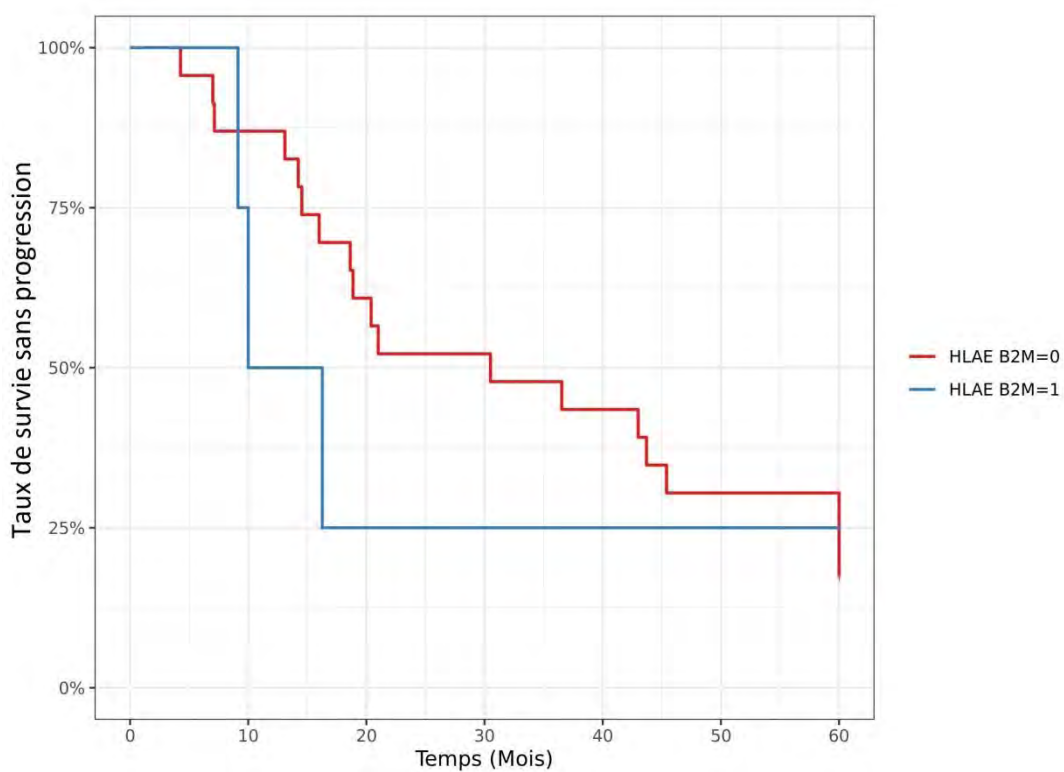


Figure 28: Survie sans progression à 5 ans en fonction du statut HLA-E/ β 2m

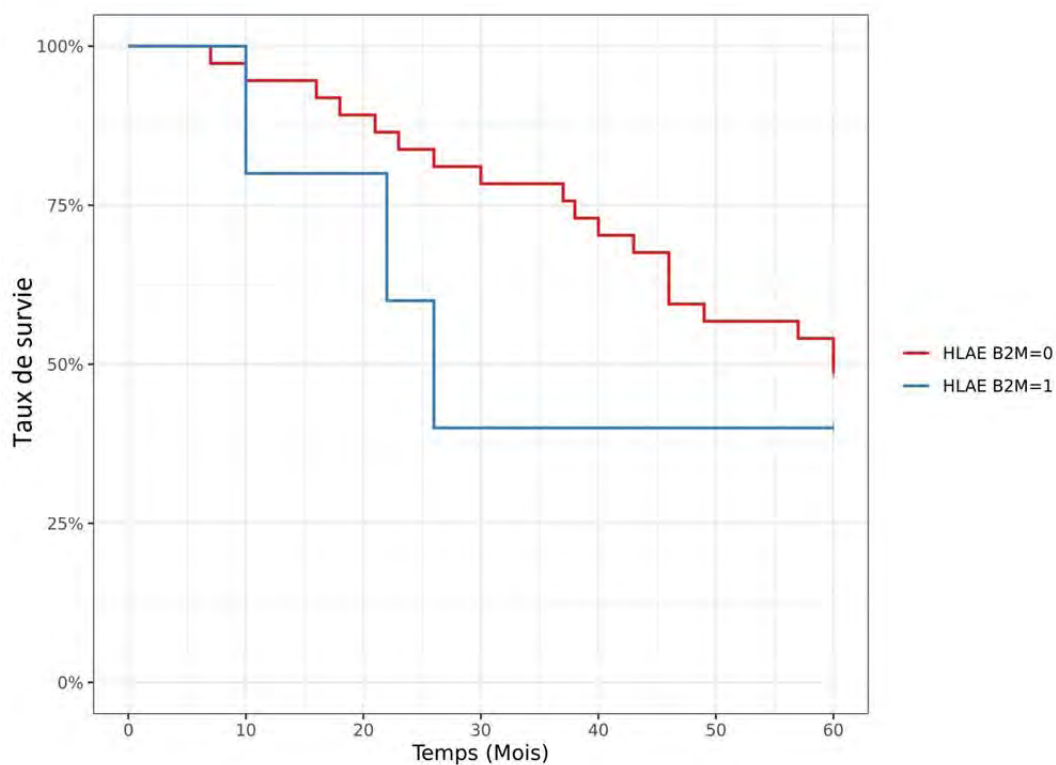


Figure 29: Survie globale à 5 ans en fonction du statut HLA-E/β2m

IV.2.2 Survie en fonction de l'expression du PDL1

De même, les résultats sur cette cohorte ne mettent pas en évidence de différence significative entre les patients PDL1+ et PDL1- (tableau 17).

Tableau 17: Comparaison de la survie sans progression et de la survie globale à 5 ans chez les patients PD-L1+ et PD-L1-.

Survie sans progression à 5 ans					
		Médiane (IC 95%)	Taux de survie (IC 95%)	p	test
PD-L1	Négatif	33,5 (4,3 ; 60)	18,2% (7,49% ; 44,1%)	0,46	Logrank
	Positif	13,1 (9,1 ; 60)	20,0% (3,46% ; 100%)	-	-
Survie globale à 5 ans					
PD-L1	Négatif	60 (7 ; 60)	50,0% (35,4% ; 70,7%)	0,50	Logrank
	Positif	51,5 (10 ; 60)	40,0% (18,7% ; 85,5%)	-	-

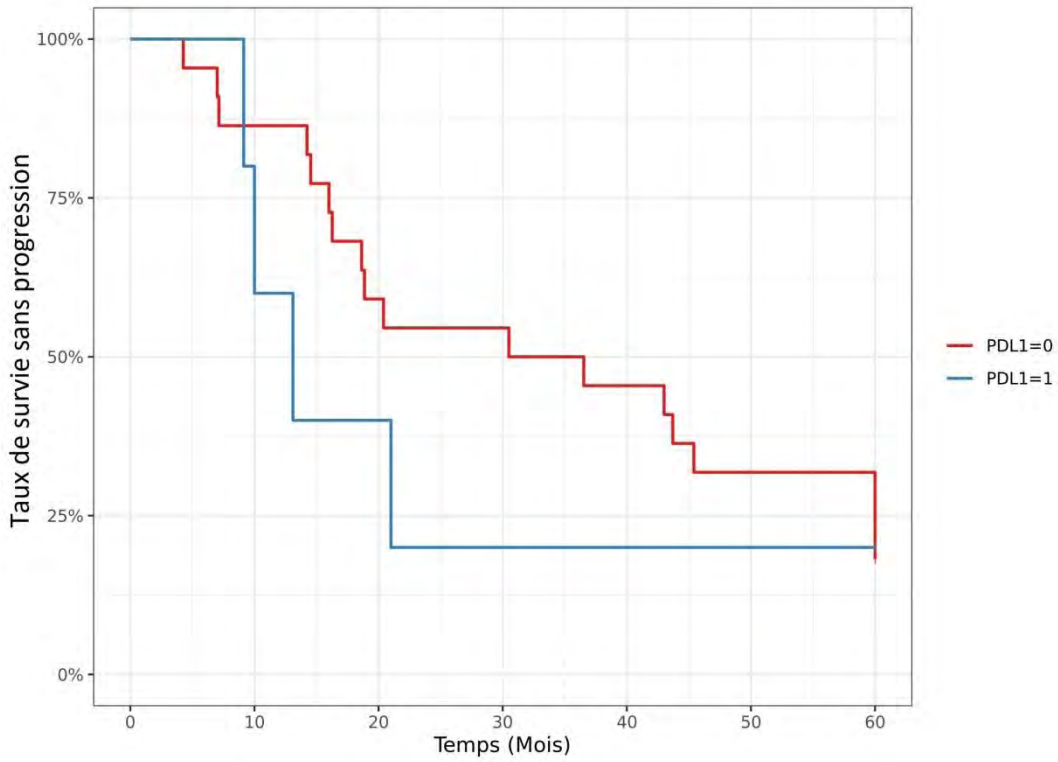


Figure 30: Survie sans progression à 5 ans en fonction du statut HLA-E/ β 2m

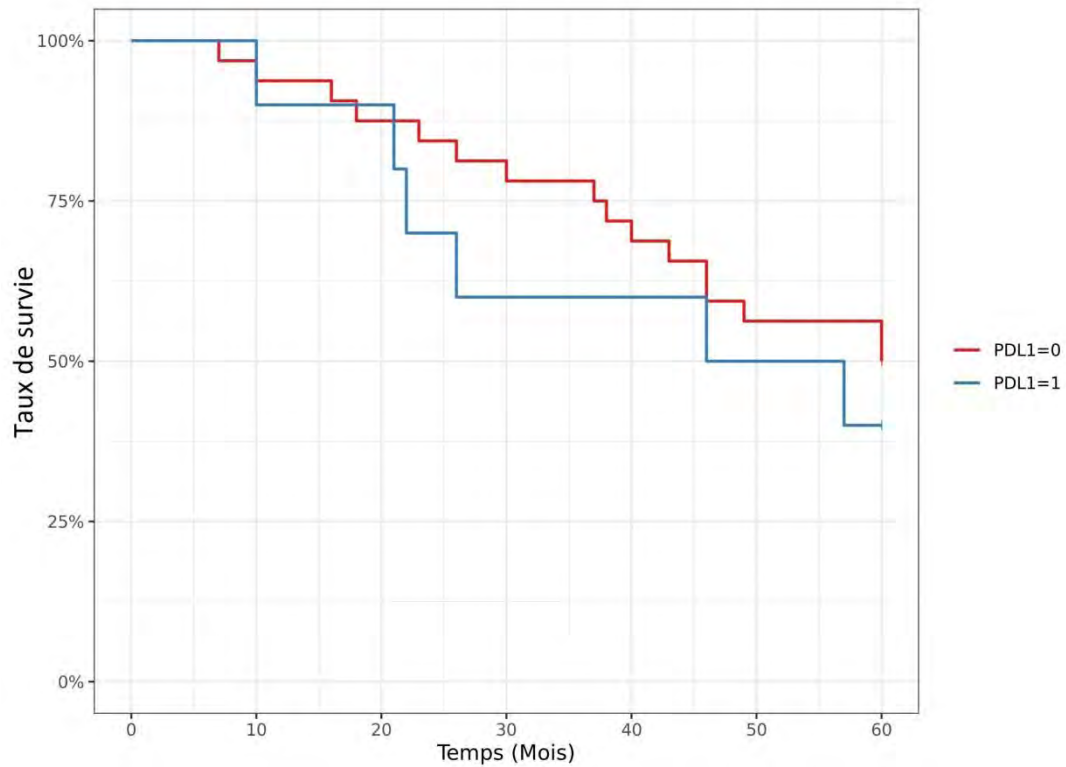


Figure 31: Survie globale à 5 ans en fonction du statut HLA-E/ β 2m

IV.3 Survie en fonction des marqueurs de l'immunité anti-tumorale

Enfin, les analyses de survie en univariée en fonction de la densité de l'infiltrat immunitaire ne mettent pas en évidence de différence statistiquement significative en considérant la densité des lymphocytes CD3+ ; CD8+ ; NKP46+ et NKG2A tant au niveau du centre tumoral qu'au niveau du front d'invasion.

L'effectif limité de cette cohorte ne nous a pas permis de réaliser d'analyse multivariée.

Discussion

Cette étude se place dans la suite de travaux visant à préciser l'expression du ligand HLA-E/ β 2m dans le microenvironnement des carcinomes colorectaux. (93) Elle a pour objectif par une approche multiparamétrique d'immunohistochimie et de cytométrie en flux de préciser le profil d'expression du ligand et de ses récepteurs dans le microenvironnement des CPNPC, puisque les données de la littérature sur le sujet sont peu nombreuses et parcellaires, et ainsi apporter d'éventuelles pistes pour compléter les stratégies d'immunothérapie. Nos résultats montrent pour la première fois que le ligand HLA-E/ β 2m est exprimé de façon aberrante par les cellules tumorales dans 11,9% (5/42) des CPNPC, sans association significative avec les différentes caractéristiques cliniques ou morphologiques, sous réserve du faible effectif de cette étude préliminaire.

Toutefois, il semble exister une association entre la densité de l'infiltrat immunitaire T et NK intra-épithélial exprimant le récepteur inhibiteur NKG2A et l'expression du ligand HLA-E/ β 2m : en effet, l'infiltrat lymphocytaire T CD3+, CD8+ et NKp46+ et NKG2A+ semble être plus dense dans les CPNPC HLA-E/ β 2m+ que dans les CPNPC HLA-E/ β 2m-. De plus, les analyses en cytométrie de flux de tumeurs incluses prospectivement montrent que le récepteur préférentiel des cellules immunitaires est le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A plutôt que le récepteur activateur NKG2A. Par ailleurs, nous montrons que les CPNPC HLA-E/ β 2m expriment également préférentiellement le ligand PD-L1.

Une seule étude ayant permis de caractériser l'expression du ligand HLA-E/ β 2m dans les CPNPC par les cellules tumorales a été publiée, celle de l'équipe de Yazdi & al (99) Il s'agit d'une étude sur 197 patients visant à préciser l'impact pronostique de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral en lymphocytes T CD8+ et de la perte d'expression des molécules HLA classique (HLA-A ; B et C) et non classique (HLA-E). Cette étude n'a pas permis de démontrer un lien statistique entre expression d'HLA-E et les caractéristiques morphologiques des CPNPC inclus (n'intéressant que les adénocarcinomes). De même, dans notre étude, l'expression du ligand HLA-E/ β 2m ne semble associé à aucune donnée clinique, notamment la consommation de tabac, ou les données morphologiques recueillies, ces données restant toutefois à vérifier sur une cohorte plus large afin d'obtenir une puissance statistique suffisante.

La grande différence que nous retrouvons entre notre étude et celle de l'équipe de Yazdi & al est la fréquence d'expression du ligand HLA-E/ β 2m : nous retrouvons environ 12% de tumeurs HLA-E/ β 2m + alors que l'étude néerlandaise met en évidence un taux de 72% de tumeurs HLA-E+. Cette différence peut être expliquée par plusieurs facteurs : tout d'abord, les méthodes de quantification de l'expression d'HLA-E diffèrent entre ces deux études. Nous avons appliqué la même méthode que celle déjà utilisée et publiée dans les carcinomes colorectaux (93,100,101) pour définir un CPNPC HLA-E/ β 2m +, à savoir une double expression de HLA-E et de la β 2microglobuline par les cellules tumorales, c'est-à-dire un score 2+ sur au moins 5% des cellules tumorales, et pour la β 2microglobuline une expression par au moins 10% des cellules tumorales. Or, les auteurs néerlandais utilisent un système de quantification selon Ruiters & al correspondant à la somme du score d'intensité et du score de cellules tumorales positives sans seuil défini pour une expression minimale et sans exiger une co-expression d'HLA-E et β 2m pour une définir une tumeur comme HLA-

E/ β 2m. (99) Ainsi, le statut double expresseur HLA-E et β 2m n'est pas précisé dans ce papier même si toutefois, l'expression de la β 2m était beaucoup plus fréquente dans l'étude néerlandaise que dans la nôtre (respectivement 76% contre seulement 35,7% dans notre étude). Il faut noter que notre étude et celle de l'équipe néerlandaise n'utilisent pas le même clone pour qualifier l'expression de la β 2microglobuline, bien que les deux études soient réalisées sur coupe entière et qu'elles aient quantifiées uniquement l'expression du ligand HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales, il faut tout de même noter que nous n'avons pas utilisé le même clone pour l'étude de l'expression de la β 2microglobuline ce qui peut expliquer en partie cette différence. Il convient donc de poursuivre ces travaux sur de plus grands effectifs.

Enfin, récemment un travail permettant une analyse spatiale de l'expression des molécules HLA de classe I et II et leur impact clinique dans les CPNPC a été publié. Cette étude vise à différencier et à caractériser l'expression des molécules HLA classe I et II tant par les cellules tumorales que par les cellules stromales. Bien que cette étude n'intéresse pas l'expression d'HLA-E, il nous paraît tout à fait opportun de poursuivre ces travaux d'analyse spatiale. En effet, selon notre expérience développée au cours de cette étude, l'expression d'HLA-E et de la β 2m sont extrêmement hétérogène au sein des tumeurs, tant en différenciant les cellules tumorales des cellules du stroma qu'en prenant en compte le centre de la tumeur et le front d'invasion. Ces données pourraient apporter de nombreuses réponses, notamment sur la capacité des cellules tumorales à présenter des profils phénotypiques hétérogènes au sein d'une même lésion.

Dans notre étude, nous avons effectivement retrouvé une faible expression de la β 2m par les cellules tumorales : seulement 15 tumeurs présentent une expression significative de la β 2m (soit 35,7%). De nombreux travaux se sont concentrés sur la caractérisation de l'expression des molécules HLA de classe I et sur l'expression de la chaîne β 2microglobuline. De façon assez surprenante par rapport aux carcinomes colorectaux notamment où l'expression de la β 2microglobuline est largement conservée, elle se retrouve limitée dans les CPNPC (102). Peu de CPNPC présentent de mutations du gène de la β 2microglobuline mais de nombreux phénomènes épigénétiques sont suspectés d'être à l'origine de cette expression down-régulé, probablement en lien avec la sous-régulation des molécules HLA dites classiques, retrouvées dans environ 30 à 40% des CPNPC, phénomène classiquement décrit pour expliquer l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire lymphocytaire T notamment.(103,104) Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier si le promoteur du gène de la β 2microglobuline est hypométhylé dans les CPNPC et de corrélérer ces résultats avec l'expression de la protéine sur des cas plus récents. En effet, les cas inclus dans cette étude sont des cas anciens (datant de 2005 à 2015) et certains sites antigéniques peuvent s'altérer avec le temps de stockage.

Concernant l'étude in situ de la densité de l'infiltrat immunitaire, nous avons fait le choix de ne caractériser que les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), comme nous l'avons fait dans les CCR et de ne pas prendre en compte l'infiltrat présent dans le stroma. En effet, il s'agit de cellules immunitaires directement au contact des cellules tumorales, contrairement aux cellules du stroma tumorale, et pouvant ainsi interagir préférentiellement via le récepteur CD94/NKG2A avec son ligand spécifique HLA-E/ β 2m exprimé par la cellule tumorale.

En utilisant cette approche, nous montrons pour la première fois dans les CPNPC que l'infiltrat en lymphocytes T CD3+, CD8+, en cellules NK NKG2A+ et en cellules T et/ou NK NKG2A+ est plus important dans les CPNPC HLA-E/ β 2m+ que dans les CPNPC HLA-E/ β 2m-, tant au centre de la lésion tumorale qu'au niveau du front d'invasion. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux montrés dans les CCR, où les CCR HLA-E/ β 2m+ étaient significativement plus riches en lymphocytes T CD3+ et surtout en lymphocytes exprimant le récepteur spécifique inhibiteur CD94/NKG2A (93), suggérant de ce fait un même mécanisme d'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire par l'intermédiaire de l'activation de ce nouveau point de contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale. De manière intéressante, il semble également que la densité en cellules immunitaire soit liée au statut tabagique et à la quantité de tabac consommée par le patient. En effet, nous avons retrouvé une corrélation significative entre la densité lymphocytaire CD8+ et la quantité de tabac estimée (en P-A). Ces résultats sont tout à fait en accord avec les données de la littérature montrant que le tabac induit une charge mutationnelle importante, elle-même à l'origine de la production de nombreux néo-antigènes et donc l'afflux de nombreux lymphocytes T CD8+, à l'instar des CCR de type MSI avec instabilité des séquences microsatellites présentant une charge mutationnelle et un infiltrat T CD8+ importants. Notre cohorte, de petite taille, n'a cependant pas permis de montrer une corrélation entre le tabac et l'expression du ligand HLA-E/ β 2m+, comme les précédentes études ont pu montrer une corrélation entre le statut MSI, l'expression du ligand HLA-E/ β 2m+ et la densité en TILs CD8+ et CD94+. (93) Ces tumeurs très immunogènes étant d'ailleurs des cellules qui répondent le mieux aux immunothérapies. (105,106)

D'ailleurs, nous montrons que les CPNPC HLA-E/ β 2m+ expriment plus fréquemment le ligand PD-L1 de façon significative. Une des hypothèses que nous pouvons formuler est que ces tumeurs auraient la capacité de mettre en œuvre en parallèle plusieurs moyens d'échappement au système immunitaire, laissant supposer qu'une immunothérapie ciblant le point de contrôle HLA-E/ β 2m+ comme le Monalizumab pourrait être efficace chez ces patients en synergie ou après échappement aux anti-PD-L1.

Les résultats de cytométrie en flux confirment et étendent nos résultats en immunohistochimie. Tout d'abord, ils confirment que c'est la chaîne NKG2A, inhibitrice qui est majoritairement exprimée à la surface des cellules CD94+. D'autre part, ces résultats nous confirment que ce récepteur est majoritairement présent à la surface des cellules NK.

Nous n'avons pas démontré d'implication pronostique de l'infiltrat en cellules T CD8+, ni d'impact pronostique de la surexpression par les cellules tumorales d'HLA-E. Toutefois, l'effectif de notre cohorte reste faible avec peu de tumeurs HLA-E/ β 2m+. Il convient d'étudier l'impact pronostique de ces variables, comme le NKG2A, sur une cohorte plus large de patients. L'étude néerlandaise a quant à elle montré que l'infiltrat en lymphocytes T CD8+ participait à un pronostic plus favorable quand les cellules tumorales conservaient l'expression des molécules HLA classiques et étaient HLA-E négatives. Cet impact pronostique était aboli quand les cellules tumorales exprimaient HLA-E, en accord avec les données dans les carcinomes colo-rectaux. Toutes ces données vont dans le sens d'un mécanisme d'échappement de la cellule tumorale à la réponse immunitaire par une expression aberrante du ligand HLA-E/ β 2m, inhibant la réponse T cytotoxique anti-tumorale.

Toutefois, plusieurs facteurs limitent les résultats que nous avons obtenus : d'une part, il s'agit d'une étude rétrospective impliquant une proportion importante de données manquantes, notamment concernant les données de rechute et de survie sans rechute, puisque de nombreux patients n'étaient pris en charge au CHU de Nantes que pour la prise en charge chirurgicale et le suivi oncologique était souvent réalisé dans différents centres distants. Il s'agit d'une cohorte de taille modérée, notamment par rapport aux précédents travaux réalisés sur les cancers colorectaux puisqu'elle ne comporte que 42 patients inclus. Les analyses de survie n'ont pas pu être réalisées sur des données de survie sans récurrence. Ainsi, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'impact pronostique de l'expression du PDL1 contrairement à ce qui a été publié dans la littérature. Toutefois, il convient de signaler qu'il s'agit uniquement de patients ayant bénéficié d'une résection chirurgicale à des stades globalement précoces et ainsi, l'expression du PDL1 ne grève pas autant le pronostic que dans les stades plus avancés, notamment métastatiques.

L'ensemble de ces données suggèrent donc une efficacité potentielle du Monalizumab dans les CPNPC surexpriment HLA-E, et offre de nouvelles perspectives d'immunothérapie chez ses patients.

Perspectives

Ce travail préliminaire sur une petite cohorte de CPNPC pour caractériser l'expression du ligand HLA-E/ β 2m présente des résultats tout à fait encourageants et souligne le besoin d'élargir cette cohorte de patients pour définir de façon précise le rôle du ligand HLA-E/ β 2m dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. Ainsi, on peut entrevoir dans un futur proche une nouvelle logique de thérapie personnalisée dans laquelle le « statut immunitaire » de chaque tumeur serait déterminé pour pouvoir proposer au patient une immunothérapie la plus adaptée possible et potentiellement la plus efficace possible.

Annexes

Stade TNM dans les CPNPC (30)

CLASSIFICATION TNM 8^{ème} EDITION

	Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
	T0	Absence de tumeur identifiable.
	Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
T - Tumeur	T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).
	T1a(mi)	Adénocarcinome minimalement-invasif
	T1a	≤ 1cm
	T1b	> 1 cm et ≤ 2 cm
	T1c	> 2 cm et ≤ 3 cm
	T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants -envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, -envahissement de la plèvre viscérale, -existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive
	T2a	> 3 cm mais ≤ 4 cm
	T2b	> 4 cm mais ≤ 5 cm
	T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , OU associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe , OU envahissant directement : -la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), -le nerf phrénique, -la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.
	T4	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : -le médiastin, -le cœur ou les gros vaisseaux, -la trachée, ou la carène -le diaphragme, -le nerf récurrent, -l'œsophage, -un(des) corps vertébral(ux).
N - Adénopathies	Nx	Envahissement locorégional inconnu.
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
	N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
	N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux
	N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou controlatérales.
Métastases	M0	Pas de métastase à distance.
	M1	Existence de métastases :
	M1a	Nodule(s) tumoral(ux) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
	M1b	Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe
	M1c	Plusieurs métastases extrathoraciques dans un seul ou plusieurs organes

Stadification des CPNPC (30)

	N0	N1	N2	N3	M1a-b <i>Tout N</i>	M1c <i>Tout N</i>
T1a	IA-1	II B	III A	III B	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	II B	III A	III B	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	II B	III A	III B	IV-A	IV-B
T2a	IB	II B	III A	III B	IV-A	IV-B
T2b	II A	II B	III A	III B	IV-A	IV-B
T3	II B	III A	III B	III C	IV-A	IV-B
T4	III A	III A	III B	III C	IV-A	IV-B

Bibliographie

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mai 2021;71(3):209-49.
2. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* déc 2011;32(4):605-44.
3. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. :372.
4. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol.* mai 2011;24(5):653-64.
5. Pikor LA. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer.* 2013;11.
6. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: Male:Female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer.* 1 nov 2005;117(2):294-9.
7. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci.* 23 avr 2018;19(4):1259.
8. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 1 juill 2008;132(7):1073-8.
9. Sivakumar S, Lucas FAS, McDowell TL, Lang W, Xu L, Fujimoto J, et al. Genomic Landscape of Atypical Adenomatous Hyperplasia Reveals Divergent Modes to Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 15 nov 2017;77(22):6119-30.
10. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* juill 2016;25(3):447-68.
11. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* févr 2011;6(2):244-85.
12. Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A, Damiani S, Cavazza A, Comin CE. Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. :7.
13. Pan Y, Zhang Y, Li Y, Hu H, Wang L, Li H, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: A comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. *Lung Cancer.* mai 2014;84(2):121-6.
14. Nishino M, Klepeis VE, Yeap BY, Bergethon K, Morales-Oyarvide V, Dias-Santagata D, et al. Histologic and cytomorphic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* nov 2012;25(11):1462-72.
15. Caso R, Sanchez-Vega F, Tan KS, Mastrogiacomo B, Zhou J, Jones GD, et al. The Underlying Tumor Genomics of Predominant Histologic Subtypes in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* déc 2020;15(12):1844-56.
16. Denisov EV, Schegoleva AA, Gervas PA, Ponomaryova AA, Tashireva LA, Boyarko VV, et al. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression. *Lung Cancer.* sept 2019;135:21-8.
17. Breuer RH, Pasic A, Smit EF, van Vliet E, Noordegraaf AV, Risse EJ, et al. The Natural Course of Preneoplastic Lesions in Bronchial Epithelium. :8.
18. Gester F, Paulus A, Sibille A, Corhay JL, Duysinx B, Louis R. FACTEURS PRONOSTIQUES DU CANCER PULMONAIRE NON À PETITES CELLULES. *Rev Med Liège.* :6.

19. Marijon H, Bouyon A, Vignot S, Besse B. Facteurs pronostiques et prédictifs des cancers bronchiques. *Bull Cancer (Paris)*. avr 2009;96(4):391-404.
20. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic Factors in Non-small Cell Lung Cancer. *Chest*. sept 2002;122(3):1037-57.
21. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. janv 2016;11(1):39-51.
22. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Performance Status and Smoking Status Are Independent Favorable Prognostic Factors for Survival in Non-small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Analysis of 26,957 Patients with NSCLC. *J Thorac Oncol*. mai 2010;5(5):620-30.
23. Marijon H, Bouyon A, Vignot S, Besse B. Facteurs pronostiques et prédictifs des cancers bronchiques. *Bull Cancer (Paris)*. avr 2009;96(4):391-404.
24. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. mai 2011;24(5):653-64.
25. Yuan G, Zhan C, Huang Y, Zhu D, Xie H, Wei T, et al. Clinical characteristics and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma of the lung: a population-based analysis. *PeerJ*. 30 avr 2019;7:e6724.
26. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. mai 2011;24(5):653-64.
27. Chen R, Yang X, Ding Z, Zhu L, Lu S, Yu Y. Lung squamous cell carcinoma: A postoperative recurrence analysis of keratinizing and nonkeratinizing subtypes. *Eur J Surg Oncol*. mai 2019;45(5):838-44.
28. Kuo S-W, Chen J-S, Huang P-M, Hsu H-H, Lai H-S, Lee J-M. Prognostic significance of histologic differentiation, carcinoembryonic antigen value, and lymphovascular invasion in stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. oct 2014;148(4):1200-1207.e3.
29. Ahmad A, Gadgeel SM, éditeurs. *Lung Cancer and Personalized Medicine: Novel Therapies and Clinical Management* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 21 sept 2021]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 890). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24932-2>
30. Couraud PS. Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. 2021;75.
31. Lantuejoul S, Damotte D, Hofman V, Adam J. Programmed death ligand 1 immunohistochemistry in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Dis*. janv 2019;11(S1):S89-101.
32. Marie-Pierrette C. Recommandations pour le testing ALK dans les CBNPC. 2017;3.
33. Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for ALK and ROS1 in Lung Cancer: Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 1 août 2018;142(8):922-8.
34. Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, Dennis PA, Otterson GA, Bueno R, et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget*. 30 mars 2014;5(6):1392-433.
35. Molecular origins of lung cancer.pdf.
36. Cheung AH-K, Tong JH-M, Chung L-Y, Chau S-L, Ng CS-H, Wan IYP, et al. EGFR mutation exists in squamous cell lung carcinoma. *Pathology (Phila)*. avr 2020;52(3):323-8.
37. Sequist LV, Joshi VA, Jänne PA, Muzikansky A, Fidias P, Meyerson M, et al. Response to Treatment and Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Somatic *EGFR* Mutation Testing. *The Oncologist*. janv 2007;12(1):90-8.

38. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor *EML4-ALK*. *J Clin Oncol*. 10 sept 2009;27(26):4247-53.
39. Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surg Pathol Clin*. mars 2020;13(1):17-33.
40. Cottrell TR, Taube JM. PD-L1 and Emerging Biomarkers in Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer J*. janv 2018;24(1):41-6.
41. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 10 nov 2016;375(19):1823-33.
42. Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. mai 2019;393(10183):1819-30.
43. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. oct 2013;14(10):1014-22.
44. Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol*. nov 2014;35(11):571-80.
45. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*. mars 2019;120(3):2756-65.
46. Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, Feuillet V, Barrin S, Kantari-Mimoun C, et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci*. 24 avr 2018;115(17):E4041-50.
47. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 24 juill 2017;8:892.
48. Hadad U, Thauland TJ, Martinez OM, Butte MJ, Porgador A, Krams SM. NKp46 Clusters at the Immune Synapse and Regulates NK Cell Polarization. *Front Immunol* [Internet]. 25 sept 2015 [cité 22 sept 2021];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00495/abstract>
49. Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 24 sept 2019;10:2278.
50. Uribe-Querol et Rosales - Neutrophils in Cancer Two Sides of the Same Coin.pdf.
51. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. févr 2013;13(2):145-9.
52. Vallentin B, Barlogis V, Piperoglou C, Cypowyj S, Zucchini N, Chéné M, et al. Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Cancer Immunol Res*. oct 2015;3(10):1109-14.
53. Ardain A, Marakalala MJ, Leslie A. Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*. mars 2020;159(3):245-56.
54. Yipp BG, Kim JH, Lima R, Zbytnuik LD, Petri B, Swanlund N, et al. The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. *Sci Immunol*. 28 avr 2017;2(10):eaam8929.
55. Houghton AM. Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nat Rev Cancer*. avr 2013;13(4):233-45.
56. Maddison P, Thorpe A, Silcocks P, Robertson JFR, Chapman CJ. Autoimmunity to SOX2, clinical phenotype and survival in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. déc 2010;70(3):335-9.
57. Pignolet BS, Gebauer CM, Liblau RS. Immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes associated with anti-Hu antibodies: A beneficial antitumor immune response going awry. *OncoImmunology*. déc 2013;2(12):e27384.
58. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*. janv 2019;19(1):9-31.

59. Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. juill 2016;16(7):447-62.
60. Schmid MC, Varner JA. Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *J Oncol*. 2010;2010:1-10.
61. Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S, et al. Non-small Cell Lung Cancer Induces an Immunosuppressive Phenotype of Dendritic Cells in Tumor Microenvironment by Upregulating B7-H3. *J Thorac Oncol*. juill 2011;6(7):1162-8.
62. Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. Human Dendritic Cells Produce TGF- β 1 under the Influence of Lung Carcinoma Cells and Prime the Differentiation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 1 mars 2009;182(5):2795-807.
63. Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, Aamodt H, Frafjord A, Müller E, et al. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 1 févr 2019;9:3101.
64. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Lyberis P, Bruna MC, Macri L, et al. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Neoplasms. *Ann Thorac Surg*. févr 2009;87(2):365-72.
65. Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Milleron B, Cadranell J. Neutrophil Alveolitis in Bronchioloalveolar Carcinoma. 1998;152(1):10.
66. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. avr 2012;12(4):252-64.
67. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 20 août 2009;114(8):1537-44.
68. Sfanos KS, Bruno TC, Meeker AK, De Marzo AM, Isaacs WB, Drake CG. Human prostate-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1⁺: Oligoclonality of Prostate CD8⁺ T Cells. *The Prostate*. 1 nov 2009;69(15):1694-703.
69. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clin Cancer Res*. 1 août 2004;10(15):5094-100.
70. So T, Takenoyama M, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Hanagiri T, et al. Haplotype Loss of HLA Class I Antigen as an Escape Mechanism from Immune Attack in Lung Cancer. *Cancer Res*. 1 juill 2005;65(13):5945-52.
71. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris A, Gatter K. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*. janv 1996;73(2):148-53.
72. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. févr 1997;18(2):89-95.
73. Baba T, Hanagiri T, Takenoyama M, Shiota H, Kuroda K, Shigematsu Y, et al. Identification of a lung cancer antigen evading CTL attack due to loss of human leukocyte antigen (HLA) class I expression. *Cancer Sci*. 22 juill 2010;101(10):2115-20.
74. Baba T, Hanagiri T, Ichiki Y, Kuroda K, Shigematsu Y, Mizukami M, et al. Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci*. nov 2007;98(11):1795-802.
75. Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T, Cho Y, Miyamoto M, Oizumi S, et al. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. sept 2007;98(9):1424-30.
76. He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, et al. LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Thorac Oncol*. mai 2017;12(5):814-23.
77. Blessin NC, Simon R, Kluth M, Fischer K, Hube-Magg C, Li W, et al. Patterns of TIGIT Expression in Lymphatic Tissue, Inflammation, and Cancer. *Dis Markers*. 10 janv 2019;2019:1-13.
78. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. mai 2016;44(5):989-1004.

79. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, et al. The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8 + T Cell Effector Function. *Cancer Cell*. déc 2014;26(6):923-37.
80. Ichinokawa et al. - 2019 - Downregulated expression of human leukocyte antigen.pdf.
81. HLA-E protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cité 22 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204592-HLA-E>
82. Borst L, van der Burg SH, van Hall T. The NKG2A–HLA-E Axis as a Novel Checkpoint in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*. 1 nov 2020;26(21):5549-56.
83. Posch PE, Borrego F, Brooks AG, Coligan JE. HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors. *J Biomed Sci*. sept 1998;5(5):321-31.
84. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. févr 1998;391(6669):795-9.
85. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Rotola A, Rizzo R. SARS-CoV-2 Spike 1 Protein Controls Natural Killer Cell Activation via the HLA-E/NKG2A Pathway. *Cells*. 26 août 2020;9(9):1975.
86. Grant EJ, Nguyen AT, Lobos CA, Szeto C, Chatzileontiadou DSM, Gras S. The unconventional role of HLA-E: The road less traveled. *Mol Immunol*. avr 2020;120:101-12.
87. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. déc 2018;175(7):1731-1743.e13.
88. van Hall T, André P, Horowitz A, Ruan DF, Borst L, Zerbib R, et al. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer*. déc 2019;7(1):263.
89. Wu Z, Liang J, Wang Z, Li A, Fan X, Jiang T. HLA-E expression in diffuse glioma: relationship with clinicopathological features and patient survival. *BMC Neurol*. déc 2020;20(1):59.
90. Andersson E, Poschke I, Villabona L, Carlson JW, Lundqvist A, Kiessling R, et al. Non-classical HLA-class I expression in serous ovarian carcinoma: Correlation with the HLA-genotype, tumor infiltrating immune cells and prognosis. *OncoImmunology*. 2 janv 2016;5(1):e1052213.
91. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JGH, Natanov R, Putter H, Smit VTHBM, et al. HLA-E and HLA-G Expression in Classical HLA Class I-Negative Tumors Is of Prognostic Value for Clinical Outcome of Early Breast Cancer Patients. *J Immunol*. 15 déc 2010;185(12):7452-9.
92. Levy E, Bianchini M, Von Euw E, Barrio M, Bravo A, Furman D, et al. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 1 mars 2008 [cité 21 sept 2021]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.32.3.633>
93. Eugène J, Jouand N, Ducoin K, Dansette D, Oger R, Deleine C, et al. The inhibitory receptor CD94/NKG2A on CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a promising new druggable immune checkpoint in the context of HLA-E/β2m overexpression. *Mod Pathol*. mars 2020;33(3):468-82.
94. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisse CL, Jotereau F, et al. HLA-E/β2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer*. 15 août 2012;131(4):855-63.
95. Hiraoka N, Ino Y, Hori S, Yamazaki-Itoh R, Naito C, Shimasaki M, et al. Expression of classical human leukocyte antigen class I antigens, HLA-E and HLA-G, is adversely prognostic in pancreatic cancer patients. *Cancer Sci*. août 2020;111(8):3057-70.
96. Seliger B, Jasinski-Bergner S, Quandt D, Stoehr C, Bukur J, Wach S, et al. HLA-E expression and its clinical relevance in human renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 11 oct 2016;7(41):67360-72.
97. Derré L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, et al. Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes: Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells. *J Immunol*. 1 sept 2006;177(5):3100-7.
98. Lantuejoul S, Damotte D, Hofman V, Adam J. Programmed death ligand 1 immunohistochemistry in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Dis*. janv 2019;11(S1):S89-101.

99. Yazdi MT, van Riet S, van Schadewijk A, Fiocco M, van Hall T, Taube C, et al. The positive prognostic effect of stromal CD8+ tumor-infiltrating T cells is restrained by the expression of HLA-E in non-small cell lung carcinoma. *Oncotarget*. 19 janv 2016;7(3):3477-88.
100. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisse CL, Jotereau F, et al. HLA-E/ β 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer*. 15 août 2012;131(4):855-63.
101. Denis Musquer M, Jouand N, Pere M, Lamer JE, Bézieau S, Matysiak T, et al. High-Density of Fc γ RIIIA+ (CD16+) Tumor-Associated Neutrophils in Metastases Improves the Therapeutic Response of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer Patients, Independently of the HLA-E/CD94-NKG2A Axis. *Front Oncol*. 15 juin 2021;11:684478.
102. Zhao Y, Cao Y, Chen Y, Wu L, Hang H, Jiang C, et al. *B2M* gene expression shapes the immune landscape of lung adenocarcinoma and determines the response to immunotherapy. *Immunology*. 21 juin 2021;imm.13384.
103. Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Shiota H, Ichiki Y, et al. Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. mai 2013;181(2):e57-63.
104. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris A, Gatter K. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*. janv 1996;73(2):148-53.
105. Lee V, Le DT. Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. *Immunotherapy*. janv 2016;8(1):1-3.
106. Sarshekeh AM, Overman MJ, Kopetz S. Nivolumab in the treatment of microsatellite instability high metastatic colorectal cancer. *Future Oncol*. août 2018;14(18):1869-74.

HLA-E/ β 2m - CD94/NKG2A : un nouveau point de contrôle immunitaire dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules ?

RESUME

Le but de ce travail était d'étudier le statut du ligand HLA-E/ β 2m et du microenvironnement immunitaire dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) et leur impact pronostique. L'expression de HLA-E/ β 2m et de son récepteur inhibiteur CD94/NKG2A a été étudiée dans une cohorte de 42 patients opérés pour un CPNPC. Il semble que l'expression aberrante du ligand HLA-E/ β 2m soit relativement fréquente dans les CPNPC et associée à une densité en TIL-IEL plus élevée sans impact pronostique démontré. Les TIL-IEL CD94+ expriment majoritairement la chaîne inhibitrice NKG2A et correspondent à des lymphocytes NK. Nos résultats sont limités par le faible effectif de la cohorte et nécessitent d'être confirmés dans des travaux ultérieurs afin de préciser le rôle et l'implication thérapeutique de ce nouveau « checkpoint » inhibiteur dans les CPNPC.

MOTS-CLES

CARCINOME PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES – HLA-E/B2M – LYMPHOCYTES INTRA-TUMORAUX INTRA-EPITHELIAUX – CD94/NKG2A