



## L'immunothérapie dans le cancer broncho-pulmonaire : point de vue du pathologiste Immunotherapy in lung cancer : point of view of the pathologist

Mona Mlika, Faouzi Mezni

*Hôpital Abderrahman Mami, Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis El Manar*

### RÉSUMÉ

L'immunothérapie dans le cancer du poumon suscite un grand engouement. Cet engouement est expliqué par le gain en termes de survie sans progression qu'elle peut apporter. La place du testing PD-L1 est importante à connaître et à comprendre. Vu le nombre de clones disponibles sur le marché et de systèmes mis en place dans les différents laboratoires de pathologie, il était important de réaliser une mise au point utile aussi bien aux pathologistes qu'aux médecins traitants afin de maîtriser les différents fondamentaux et les éventuels écueils.

**Mots clés :** cancer du poumon, immunothérapie, immunohistochimie

### SUMMARY

Immunotherapy in lung cancer has been playing a key role. This role can be explained by the gain in term of survival without progression. The place of the PD-L1 testing is important to know. Because of the multiple clones available and the different systems available in pathology labs, it was important to present the last recommendations concerning PD-L1 testing in order to make pathologists and treating doctors aware of the major principles and the different limits.

**Key words:** lung cancer, immunotherapy, immunohistochemistry

---

Correspondance  
Mouna Mlika  
E-mail: mlika.zorgati.mona@hotmail.com

## INTRODUCTION

Depuis l'année 2014, les immunothérapies ciblant PD-1 (programmed cell death protein 1) et PD-L1 (programmed cell death ligand 1) ont été largement testées dans le cadre d'essais cliniques en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie et la radiothérapie. L'examen anatomopathologique joue un rôle théranostique clé dans le cadre de la sélection des patients et la prédiction de la réponse thérapeutique.

## INDICATIONS DE L'IMMUNOTHÉRAPIE AVEC TESTS COMPAGNONS OU TESTS COMPLÉMENTAIRES :

Les indications de l'immunothérapie selon les recommandations du groupe international d'étude du cancer du poumon (IASLC) pour l'année 2019 sont:

- En première, seconde ou nième ligne dans le cadre des carcinomes non à petites cellules (CNPC) pulmonaires métastatiques aux USA et au Japon
- En première ligne et en monothérapie dans le cadre des CNPC localement avancés non résécables chirurgicalement ou non candidats à une radiochimiothérapie
- En troisième ou nième ligne et en monothérapie dans les carcinomes à petites cellules (CPC) métastatiques
- En première ligne et en association avec la chimiothérapie dans les CNPC métastatiques ou CPC métastatiques en tant que traitement de consolidation pour les tumeurs non résécables
- En monothérapie dans les CNPC stade III localement avancés sans progression après chimio-radiothérapie.

Selon ces différentes indications, le testing PD-L1 peut être réalisé en tant que test compagnon ou test complémentaire. Les tests compagnons sont des tests obligatoirement annexés à des traitements qui ne peuvent pas être débutés sans le résultat du testing. Les tests complémentaires ne sont pas indispensables à la mise des patients sous traitement mais permettent de sélectionner les patients et de prédire la réponse au traitement. Seul le pembrolizumab dispose d'un test compagnon qui doit être réalisé avant la mise sous traitement et ce en première ligne dans les CNPC métastatiques. Le testing PD-L1 n'est pas nécessaire à la mise des patients sous nivolumab et

atezolizumab dans les CNPC métastatiques en seconde ou nième ligne. Pour les CNPC localement avancés, la mise sous Durvalumab nécessite un test compagnon seulement en Europe et au Japon (1).

## PRÉLÈVEMENTS NÉCESSAIRES À LA RÉALISATION D'UN TESTING PD-L1:

Plusieurs prélèvements sont réceptionnés dans un laboratoire de pathologie. Il s'agit essentiellement de prélèvements tissulaires et de prélèvements liquidien.

Les prélèvements tissulaires sont représentés par les biopsies bronchiques, trans-thoraciques ou chirurgicales ainsi que les pièces opératoires. Les prélèvements liquidien sont représentés par les cytologies bronchiques par aspiration ou trans-bronchiques.

Concernant les prélèvements tissulaires, la reproductibilité des résultats du testing PD-L1 entre les biopsies tissulaires ainsi que les pièces opératoires et la concordance des résultats entre les sites primitifs et les sites secondaires ont été largement analysées. En effet, l'expression de PD-L1 présente une hétérogénéité intra-tumorale et inter-tumorale (entre site primitif et secondaire). L'hétérogénéité intra-tumorale peut être à l'origine d'une discordance des résultats entre les biopsies et les pièces opératoires. Cette reproductibilité dépend du seuil de positivité utilisé pour les différents clones d'anticorps. Concernant les biopsies, un nombre de prélèvements minimum de 3 à 4 prélèvements tumoraux sont nécessaires pour assurer une sensibilité de 90%. La reproductibilité entre les prélèvements cytologiques et tissulaires est rapportée comme étant médiocre. Ceci peut être expliqué par l'utilisation de fixateurs alcooliques pour les prélèvements cytologiques, l'hétérogénéité tumorale et les délais pouvant être observés entre le prélèvement tissulaire et liquidien pouvant expliquer une expression variable de PD-L1. L'utilisation de prélèvements liquidien pour le testing PD-L1 n'a pas été validée dans le cadre d'essais thérapeutiques (2). Concernant l'hétérogénéité inter-tumorale, la concordance entre le site primitif et secondaire variait entre 67 et 90% dans les différentes séries publiées (3). Ceci étant dû à différents clones, seuils de positivité et types d'études rapportés (1,4,5). Une radio-chimiothérapie néo-adjuvante ainsi que l'utilisation de thérapies ciblées anti-EGFR peut également expliquer une discordance

des résultats d'expression de PD-L1 en néoadjuvant et en post-chimiothérapie (1).

Concernant les prélèvements liquidiens, plusieurs réserves sont actuellement émises, quant à la concordance des résultats avec les prélèvements tissulaires et quant aux conditions pré-analytiques qui peuvent entraver l'intensité ou la distribution du signal.

#### **L'IMMUNOHISTOCHEMIE : SEULE TECHNIQUE UTILISÉE DANS UN LABORATOIRE DE PATHOLOGIE POUR DÉTERMINER L'EXPRESSION DE PD-L1 :**

La seule technique utilisée dans un laboratoire de pathologie pour la mise en évidence de l'expression de PD-L1 est l'immunohistochimie (6,7). Cette technique, également réalisée pour la mise en évidence de la translocation ALK et ROS1 repose sur le principe de révélation d'un complexe immun fait d'un antigène disposé sur la cellule cible et d'un anticorps ciblant l'antigène en question (6,7). Ces complexes immuns sont rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré. Afin d'amplifier le signal, un anticorps primaire et un anticorps secondaire sont utilisés ainsi que différents systèmes d'amplification sont mis en place par différents fabricants (8,9). Les principales étapes de l'immunohistochimie sont représentées par: la fixation au formol tamponné à 10%, l'inclusion en paraffine, la coupe, le déparaffinage et l'hydratation, le démasquage antigénique, le blocage des peroxydases endogènes, l'anticorps primaire, l'incubation, différentes étapes de lavage, l'addition d'antigène secondaire, l'incubation, différentes étapes de lavage, l'addition de substrat, différentes étapes de lavage et une dernière étape de contre-coloration. Chacune de ces étapes présente des limites et des risques qui peuvent entraver le résultat final. Ces étapes nécessitent une expertise extrême et doivent être réalisées dans un service de Pathologie expérimenté.

Concernant l'immunothérapie, 2 principaux systèmes peuvent être utilisés :

- Systèmes automatisés : les anticorps sont fournis sous forme de kits prêts à l'utilisation (ready-to-use) avec des automates spécifiques. Les kits et les anticorps sont dépendants de l'automate fourni et ne peuvent pas être utilisés avec un autre automate. Le mode d'utilisation doit être strictement conforme aux instructions du fabriquant.

Ces systèmes ont l'avantage d'être reproductibles et l'inconvénient d'être extrêmement coûteux. Ces anticorps ont été utilisés dans des essais cliniques ayant permis de spécifier les seuils de positivité.

- Systèmes développés par les laboratoires de pathologie (LDT : laboratory developing tests). Les laboratoires de pathologie sont approvisionnés en concentrés d'anticorps qu'ils utilisent avec leurs propres automates. Les clones utilisés peuvent être les mêmes clones que ceux utilisés par les systèmes automatisés ou bien des clones utilisés dans le cadre de la recherche. Ce type de système est moins coûteux que le système automatisé mais il nécessite une longue période de mise en place et de validation afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats avec les systèmes automatisés précédemment cités. Selon les recommandations du collège des pathologistes Américains, un minimum de 20 tests positifs et 20 tests négatifs selon les systèmes automatisés doivent être validés et un système précis de contrôle qualité doit être mis en place avant de pouvoir délivrer des résultats aux patients (1,10).

Dans certains services de pathologie, les techniques d'immunohistochimie sont manuelles. Ce type de technique n'est pas validé pour les anticorps à rôle thérapeutique car elles ne sont pas reproductibles et fiables.

#### **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS EN IMMUNOHISTOCHEMIE :**

L'anticorps anti-PD-L1 marque les cellules tumorales, les cellules inflammatoires et les macrophages. Ce marquage est membranaire et d'intensité variable. Selon les clones utilisés et des traitements à prescrire, le marquage doit être évalué soit au niveau des cellules tumorales soit au niveau des cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages) soit au niveau des 2. Dans les différents manuels d'utilisation, deux grands types de scoring existent. Il s'agit soit d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales marquées dans le cadre du scoring des cellules tumorales (Tumour Cells TC) soit un système de scoring combiné nécessitant d'estimer le pourcentage des cellules tumorales et de cellules immunitaires (Immune Cells IC : lymphocytes et macrophages marqués). Ce dernier système de scoring est appelé système de scoring combiné. Dans les différents traitements et

dans la plupart des indications, l'estimation des cellules tumorales marquées est utilisée. Le pourcentage de cellules tumorales considère le pourcentage de cellules tumorales viables présentant un marquage membranaire indépendamment de son intensité. Le pourcentage de cellules immunitaires est la proportion de surface tumorale occupée par des cellules immunitaires marquées. Le système de scoring combiné est adapté pour le traitement à base de pembrolizumab et ce dans les CPC métastatiques, en troisième ou nième lignes (1,5,8-11).

### CLÔNES UTILISÉS EN IMMUNOHISTOCHEMIE :

Plusieurs anticorps anti-PD-L1 sont actuellement produits mais ne donnent pas tous le même profil immunohistochimique. Ceci a des répercussions sur la sélection des patients et la réponse thérapeutique. Il existe 2 grands groupes d'anticorps:

- Les anticorps compagnons utilisés dans des essais cliniques : il s'agit des anticorps SP142 (Ventana), SP263 (Ventana), 28-8 (DAKO) et 22C3 (DAKO). Ces anticorps sont associés respectivement aux traitements par l'atezolizumab (Roche/Genentech), durvalumab (AstraZeneca), nivolumab (Bristol-Myers Squibb) et pembrolizumab (Merck).

Le clone 22C3 est utilisé dans un système automatisé (PharmDx) et a reçu l'approbation FDA (Food and Drug Association aux USA), CE-IVD (Conformité Européenne marking for In Vitro Diagnostic en Europe) et PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency au Japon).

Le clone 28-8 est utilisé dans un système automatisé (PharmDx) et a reçu l'approbation FDA (Food and Drug Association aux USA).

Le clone SP263 est utilisé dans un système automatisé (VENTANA BenchMark ULTRA instrument) et a reçu l'approbation CE-IVD (Conformité Européenne marking for In Vitro Diagnostic en Europe).

Le clone SP142 est utilisé dans un système automatisé (VENTANA BenchMark ULTRA instrument) et a reçu l'approbation FDA (Food and Drug Association aux USA).

- Les anticorps commercialisés et utilisés dans certains laboratoires de pathologie et de recherche : il s'agit essentiellement des clones E1L3N et E1J2J (Cell

Signaling Technology [CST]) ou 28-8 (Abcam).

Ces différents anticorps n'ont pas la même sensibilité et affinité pour PD-L1.

Concernant le premier groupe d'anticorps, les essais thérapeutiques ont défini un seuil thérapeutique de pourcentage des cellules tumorales à partir duquel les patients sont susceptibles d'avoir une meilleure réponse aux anti-PD-L1/PD-1.

La connaissance des clones utilisés est importante dans l'interprétation des résultats. Le clone SP142 est réputé pour être le clone le moins sensible dans la mise en évidence de l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales. Le clone SP263 est réputé pour être le clone le plus sensible dans la mise en évidence de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Certaines études ont démontré une bonne concordance entre les clones 22C3, 28-8 et SP-263 avec la meilleure concordance rapportée entre les clones 22C3 et SP263. Etant donné que seul le Pembrolizumab nécessite un test compagnon (clone 22C3) pour la sélection des patients, ce clone est devenu celui le plus utilisé (1,4,5,8,10,11).

### SEUILS DE POSITIVITÉ :

Les seuils de positivité dépendent de 2 facteurs principaux: les clones utilisés et les traitements prévus pour les patients.

Ainsi, les seuils des différents clones utilisés dans les systèmes automatisés ont été déterminés dans le cadre des différents essais cliniques.

Pour le clone 22C3, PD-L1 est considéré exprimé à partir d'un seuil supérieur ou égal à 1%. Une expression élevée de PD-L1 est considérée à partir d'un seuil supérieur ou égal à 50%.

Pour le clone 28-8 et concernant les CNPC, les résultats sont rapportés comme suit: expression inférieure à 1%, supérieure ou égale à 1%, supérieure ou égale à 5% ou supérieure ou égale à 10%.

Pour le clone SP263, les seuils de positivité sont précisés en fonction du traitement à administrer.

Pour le clone SP142, le pourcentage de cellules tumorales est déterminé en premier lieu. S'il est supérieur à 50 %

le patient est candidat au traitement. Si cette proportion est inférieure à 50%, l'estimation du score immunitaire est réalisée selon un seuil limite de 10% (1).

Concernant les clones utilisés dans le cadre de systèmes utilisés par les laboratoires, les différents seuils de positivité sont établis après une période de calibrage prenant comme repère les systèmes automatisés commercialisés et tenant compte des différents contrôles qualité.

#### **CONDITIONS PRÉ-ANALYTIQUES :**

Les prélèvements adressés dans un laboratoire de pathologie subissent différentes étapes techniques permettant le diagnostic initial. Par ailleurs, ils sont souvent le siège de lésions d'ischémie froide secondaires à des délais de fixation plus ou moins longs. Les différentes étapes techniques standards réalisées dans un laboratoire de pathologie sont représentées par la fixation, la déshydratation, l'inclusion en paraffine, la coupe et la coloration standard à l'hématoxyline éosine. Ces différentes étapes sont nécessaires avant la lecture au microscope et avant d'éventuelles techniques complémentaires nécessaires au diagnostic ou à la prise en charge thérapeutique incluant les colorations spéciales, les techniques d'immunohistochimie et d'éventuelles techniques de ciblage moléculaire. Les techniques de routine réalisées dans un laboratoire de pathologie sont accessibles sur le lien suivant : <https://drive.google.com/file/d/1MhpMOPDVBTCI16nIo2I0Z-PSoi9smfKp/view?usp=sharing>.

Plusieurs conditions sont nécessaires afin que l'interprétation de l'expression du PD-L1 soit valide et fiable. Le délai de fixation recommandé par le collègue des pathologistes Américains dans le cadre des analyses moléculaires doit être inférieur à 60 minutes. Un délai supérieur à 60 minutes entraînerait une diminution de l'intensité du marquage membranaire et donc des résultats faussement négatifs. Le formol tamponné à 10% est le fixateur idéal à utiliser. Le volume de fixateur doit être suffisant avec un ratio fixateur/tissu idéal estimé à 10/1. L'utilisation de lames silanisées ne doit pas dépasser un délai de 2 mois. La durée de stockage des blocs de paraffine sur lesquels les techniques d'immunohistochimie sont réalisées ne doit pas dépasser 1 à 3 ans. Le stockage des blocs doit être réalisé dans des endroits non humides

et à l'abri de la lumière (1,12).

#### **CONDITIONS POST-ANALYTIQUES :**

Après réalisation de la technique d'immunohistochimie et afin de mettre en évidence l'expression de PD-L1, 2 principales limites doivent être évaluées : la reproductibilité inter-observateurs et la reproductibilité intra-observateurs.

Il est largement admis que la reproductibilité inter et intra-observateur est bonne pour la détermination du score des cellules tumorales et faible pour la détermination des cellules immunitaires. Dans l'étude en phase 2 BluePrint, le coefficient kappa de reproductibilité dans la détermination des cellules tumorales a été estimé entre 0.86 et 0.95. Ce taux de concordance est variable en fonction du seuil de positivité choisi et semble meilleur pour les seuils de plus de 50% (11).

#### **Items à préciser sur la fiche de renseignements adressée au pathologiste par l'oncologue médical**

Les items que l'oncologue médical doit adresser au pathologiste sont les suivants:

- Identité du patient
- Identité du médecin traitant et service d'origine
- Nature du prélèvement
- Date et heure du prélèvement
- Heure de fixation
- Le traitement anti-PD-1/PD-L1 prévu pour le patient

#### **ITEMS À MENTIONNER DANS UN COMPTE RENDU ANATOMOPATHOLOGIQUE**

Les items devant figurer dans un compte rendu anatomopathologique sont :

- La référence de l'examen
- L'identité du patient
- La nature du prélèvement
- Le fixateur utilisé

- Le diagnostic microscopique
- Le taux de cellules tumorales
- La technique utilisée : système automatisé ou système développé par le laboratoire
- Le clone utilisé ainsi que le seuil recommandé et le système de scoring recommandé tenant compte uniquement des cellules tumorales ou bien des cellules tumorales et des cellules immunitaires.
- L'utilisation d'un témoin positif
- Le pourcentage de cellules tumorales positives ou le pourcentage de cellules tumorales et de cellules immunitaires positives (1).

## CONCLUSION

Le testing PD-L1 en immuno-histochimie est indispensable pour la sélection des patients devant être mis sous immunothérapie. Les laboratoires de pathologie délivrant ces résultats doivent se conformer à différentes normes de qualité afin de délivrer une réponse valide et fiable. Le médecin oncologue doit s'assurer de la validité des clones utilisés et des techniques mises en place par le laboratoire de pathologie avant la mise des patients sous traitement.

## REFERENCES

1. Lantuejoul S, Tsao MS-, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective from the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol.*2020; 12:107-110.
2. Sakata KK, Midthun DE, Mullon JJ, Kern RM, Nelson DR, Edell ES, et al. Comparison of Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemical Staining Between Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration and Resected Lung Cancer Specimens. *Chest.* 2018;154:827–37.
3. Yoshimura K, Inoue Y, Karayama M, Tsuchiya K, Mori K, Suzuki Y, et al. Heterogeneity analysis of PD-L1 expression and copy number status in EBUS-TBNA biopsy specimens of non-small cell lung cancer: Comparative assessment of primary and metastatic sites. *Lung Cancer.*2019;134:202–9.
4. Hofman P. PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung carcinoma: which strategy should be adopted?. *Expert Rev Mol Diagn.*2017;0(0).
5. Ilie M, Hofman P. Reproducibility of PD-L1 assessment in non-small cell lung cancer — know your limits but never stop trying to exceed them. *2017;6:51–4.*
6. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016;50:411–8.
7. Pluot M, Cahn V, Ducasse A. L'immunohistochimie en anatomie pathologique ophtalmologique: Intérêt et limites. *J Fr Ophtalmol.* 2006;29:946–56.
8. Ilie M, Khambata-ford S, Copie-bergman C, Huang L, Juco J, Hofman V, et al. Correction : Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms. *Plos One.*2017;2:1–3.
9. Ilie M, Khambata-ford S, Copie-bergman C, Huang L, Juco J, Hofman V, et al. Use of the 22C3 anti – PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms. *Plos One.*2017;1:1–13.
10. Hofman P, Ilié M, Lassalle S, Long E, Bence C, Butori C, et al. PD1/PD-L1 immunohistochemistry in thoracic oncology: Where are we?. *Ann Pathol.*2017;37:39–45.
11. Hirsch FR, Mcelhinny A, Stanforth D, Ranger-moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer : Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol.*2017;12:208–22.
12. DiStasio M, Chen Y, Rangachari D, Costa DB, Heher YK, VanderLaan PA. Molecular Testing Turnaround Time for Non–Small Cell Lung Cancer in Routine Clinical Practice Confirms Feasibility of CAP/IASLC/AMP Guideline Recommendations: A Single-center Analysis. *Clin Lung Cancer.* 2017;18:e349–56.