



**HAL**  
open science

# Biomarqueurs prédictifs de résistance primaire et secondaire aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé

Julien Ancel

► **To cite this version:**

Julien Ancel. Biomarqueurs prédictifs de résistance primaire et secondaire aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé. Sciences du Vivant [q-bio]. URCA, 2024. Français. NNT: . tel-04905748

**HAL Id: tel-04905748**

**<https://hal.univ-reims.fr/tel-04905748v1>**

Submitted on 22 Jan 2025

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

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

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE CHIMIE SANTÉ N°619

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
*Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*  
*Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie*

Présentée et soutenue publiquement par

**JULIEN ANCEL**

Le 19 novembre 2024

---

**Biomarqueurs prédictifs de résistance primaire et secondaire  
aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires  
dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé**

---

Thèse dirigée par le Professeur **MYRIAM POLETTE**

## JURY

M. Alexis CORTOT,	Professeur,	Université de Lille, France,	<b>Président du jury</b>
Mme Virginie WESTEEL,	Professeur,	Université de Franche-Comté, France,	<b>Rapporteur</b>
M. Christos CHOUID,	Professeur,	Université de Créteil, France,	<b>Rapporteur</b>
M. Stéphane DEDIEU,	Professeur,	Université de Reims, France,	<b>Examineur</b>
Mme Christine GILLES,	Maître de Recherche,	Université de Liège, Belgique,	<b>Examineur</b>
M. Gaëtan DESLEE,	Professeur,	Université de Reims, France,	<b>Examineur</b>
Mme Myriam POLETTE,	Professeur,	Université de Reims, France,	<b>Directeur de thèse</b>



**A ma famille,**

## REMERCIEMENTS

A Myriam, merci de m'avoir encadré de nouveau sur une thèse, cette fois-ci bien plus longue et scientifique. Merci d'avoir toujours trouvé le temps de discuter, et quelles discussions nous avons eues et continuerons à avoir sur ces points de vue biologistes et cliniciens si complémentaires. Merci.

Au Professeur DESLEE, un grand merci pour l'accompagnement que vous me prodiguez depuis plusieurs années et pour la confiance que vous m'accordez. Je vous témoigne un immense respect et vous adresse mes sincères remerciements à travers ces quelques lignes.

Au Professeur CORTOT, un grand merci pour le temps que vous avez consacré, notamment lors du comité d'évaluation de mi-thèse. Je suis véritablement impatient de pouvoir partager du temps avec vous et de profiter de votre expérience, ainsi que de vos vastes connaissances, lors de ma future mobilité à Lille.

Au Professeur CHOUAID, qui m'accompagne depuis plusieurs années dans mon parcours, c'est un immense plaisir de pouvoir évoluer dans le domaine de la recherche clinique grâce à votre bienveillance et votre disponibilité. Par ces quelques lignes, je souhaite exprimer mon envie sincère de m'investir activement au sein du GFPC.

Merci au professeur DEDIEU pour le temps accordé à l'examen de cette thèse.

À Christine, je me permets un peu de familiarité. Nous nous connaissons maintenant depuis plusieurs années, et c'est toujours un vrai plaisir de pouvoir échanger avec toi sur des commentaires et des avis toujours très constructifs. Ces échanges m'ont permis d'évoluer, et j'espère qu'ils nous permettront encore de collaborer à l'avenir.

Au Professeur WESTEEL, un très grand merci. Je vous suis avec grand intérêt depuis mes premières années d'internat, notamment à travers l'intergroupe français de cancérologie thoracique. C'est un véritable honneur de pouvoir vous compter parmi les membres du jury de cette thèse de sciences.

À ma chérie, que dire de toutes ces années ? Un immense merci pour ton soutien. Tant de choses se sont passées : un mariage, où tu es devenue ma femme, et la naissance de notre magnifique fille ! Je ne pouvais pas rêver mieux. Il y a eu des moments moins faciles, mais tu as toujours su être présente. Merci, mon amour.

Stella, ma fille, je te dirais bien que tu m'as aidé et soutenu dans ce travail, mais nous savons tous les deux que ce n'est pas tout à fait vrai. Cependant, tu m'as apporté tellement de bonheur et d'amour, et surtout, tu m'as aidé à relativiser sur bien des aspects. Toi aussi, je t'aime. Et surtout, ne tiens pas rigueur de l'ordre d'apparition ; ta mère a voulu passer en premier.

À mon papa, merci pour ton soutien inconditionnel et tes précieux conseils tout au long de ce parcours. Ta sagesse et ton encouragement ont été une source constante de force et d'inspiration pour moi. Je t'en suis profondément reconnaissant.

À mon frère jumeau, merci d'être là, même si, comme tout le monde le sait, tu es un grand taiseux. Je suis ravi que tu aies pu nous rejoindre plus près et même assister à cette thèse avec moi. Cela me touche beaucoup.

À Maxime, que je considère comme mon binôme en clinique, toujours disponible, avec un sourire et une bonne humeur qui te définissent, et surtout devenu maintenant un excellent ami qui a vécu avec moi de grands moments de ma vie. Je sais avoir gagné bien plus qu'un collègue, et je suis ravi de pouvoir continuer à travailler à tes côtés.

À Pauline, ou plutôt popo, également devenue une très bonne amie. On a pu partager beaucoup de bons moments, et je sais qu'on en partagera encore beaucoup. Rassure-toi, Cette fois si cette thèse, on va la fêter !

À Antoine, ce collègue qui est aussi un ami. Merci pour ton soutien, notamment en tant que mixologue. J'espère que l'on pourra compter sur tes talents lors de la soirée de soutenance ! Je suis ravi de savoir que tu fais partie de l'équipe que je m'apprête à rejoindre !

À Sandra, nous nous connaissons depuis le tout début de l'internat, depuis ces premières contre-visites à l'hôpital de jour. Tu m'as vu passer de l'autre côté, et nous voici désormais à une soutenance de thèse de science. Quel chemin parcouru ! Mais toi, tu es restée constante, avec cette force d'âme que j'admire tant !

Au Professeur LEBARGY, je suis également ravi que vous puissiez assister à cette thèse de science, ou au moins à la soirée. Vous avez été un modèle dès mes premières années d'externat, lors de mon passage dans le service, et vous êtes probablement l'une des personnes qui m'ont transmis l'envie de cette spécialité. Bon, sans se mentir, ce n'est sûrement pas l'oncologie thoracique qui m'est venue de vous, mais l'envie est bien là !

À M. VALLERAND, désormais en retraite bien méritée. C'est un plaisir de reprendre le suivi de certains de vos patients. J'espère pouvoir vous compter parmi nous pour fêter cette thèse de sciences, qui repose en grande partie sur les nombreux dossiers que vous avez gérés avec rigueur, même s'ils n'étaient pas toujours informatisés !

Merci à Julie, que j'ai eu le plaisir de voir évoluer en tant qu'interne, puis chef. Finalement, nous nous retrouverons en tant que chefs de clinique, et ce sera un vrai plaisir, avec une grande confiance, connaissant ta rigueur et ton calme. Je n'oublie pas ta bonne humeur et ta gentillesse communicative au fil de ces années. Tu fais partie de l'équipe que je rejoins avec grand plaisir !

À Bérénice, je ne pouvais pas ne pas t'adresser quelques mots. Ton bonheur communicatif, ta joie, et ces soirées de jeux de société ont été à chaque fois excellentes et m'ont vraiment permis de me changer les idées.

À Sébastien et Gonzague, un énorme merci pour votre aide et l'adaptabilité dont vous avez fait preuve pour permettre la réalisation de cette thèse de science ! Au-delà de cela, quel plaisir d'échanger avec vous !

À Anne, Véronique, Christine, Nathalie, Arnaud et j'en oublie, dans cette team onco, c'est toujours un grand plaisir de pouvoir échanger, que ce soit pour la clinique ou pour la recherche !

## **RÉSUMÉ**

L'immunothérapie (IO) a transformé le traitement du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), notamment grâce au marqueur PD-L1. Cependant, l'efficacité de l'IO reste incertaine, avec des résistances primaires ou acquises. La recherche de marqueurs prédictifs de réponse à l'IO est cruciale. Dans le CBNPC, notre équipe a démontré une corrélation entre PD-L1 et la vimentine, associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Nous faisons l'hypothèse que la résistance des CBNPC aux anti-PD-1 est liée à une polarisation mésenchymateuse.

L'inhibition de la TEM en clinique étant difficile, il est essentiel d'identifier des cibles associées à la TEM. AXL est un récepteur à tyrosine kinase aux propriétés immunomodulatrices associées à la TEM. L'objectif est d'identifier les mécanismes de résistance à l'IO dans le CBNPC, avec un focus sur la TEM et AXL.

Les approches combinent des analyses bio-informatiques et des cultures innovantes de tumeurs primaires. Ces méthodes ont confirmé l'intérêt d'AXL comme marqueur de résistance à l'IO. L'étude des mécanismes d'échappement à l'IO inclut la quantification des contingents cellulaires immunitaires du microenvironnement tumoral. AXL a été validé comme marqueur prédictif de réponse à l'IO dans une cohorte rétrospective de patients CBNPC métastatique.

Ce projet, encadré par une cohorte rétrospective (MR004160420221) de patients CBNPC du CHU de Reims et par la CRB (banque n° AC-2019-340), valide AXL comme biomarqueur prédictif de la réponse à l'IO. L'étude d'AXL pourrait permettre de mieux identifier les patients bénéficiant de l'IO pour un CBNPC et d'envisager l'inhibition d'AXL pour prévenir ou lever une résistance à l'IO.

**Mots clés :** Poumon, Immunothérapie et Cancer, Marqueurs biologiques tumoraux, Transition épithélio-mésenchymateuse.

## **ABSTRACT**

Immunotherapy (IO) has transformed the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), particularly through biomarkers like PD-L1. However, IO's efficacy remains uncertain, with cases of primary or acquired resistance. Identifying predictive markers for IO response is crucial. In NSCLC, our team demonstrated a correlation between PD-L1 and vimentin, associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). We hypothesize that NSCLC resistance to anti-PD(L)1 is linked to mesenchymal polarization. Given the challenges of inhibiting EMT clinically, identifying therapeutic targets associated with EMT, particularly the receptor tyrosine kinase AXL, is essential. Our objective is to identify resistance mechanisms to IO in NSCLC, focusing on EMT and AXL.

The approaches used combined bioinformatic analyses and innovative primary tumor cultures. These methods confirmed AXL's interest as a marker of IO resistance. The study of immune escape mechanisms includes quantifying immune cell contingents in the tumor microenvironment. AXL's validation as a predictive biomarker for IO response was conducted in a retrospective clinical cohort of patients treated with first-line metastatic IO.

This project, overseen by a retrospective cohort (MR004160420221) of NSCLC patients at CHU de Reims under the supervision of doctoral candidate Julien Ancel, utilizes material provided by the CRB (bank no. AC-2019-340).

This work validates AXL as a predictive biomarker for IO response and a potential therapeutic target. Studying AXL could better identify patients benefiting from IO for NSCLC and consider AXL inhibition to prevent or overcome IO resistance.

**Keywords** : Lung cancer, Immunotherapy, Epithelial-Mesenchymal transition, Biomarker.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
RÉSUMÉ.....	4
ABSTRACT .....	5
ABRÉVIATIONS.....	8
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....	10
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX .....	14
INTRODUCTION.....	15
<b>I. Les cancers broncho-pulmonaires .....</b>	<b>15</b>
1. Épidémiologie.....	15
2. Classifications du cancer bronchique .....	16
2.1. Classification histologique .....	16
2.2. Classification moléculaire .....	18
2.3. Classification clinique .....	21
<b>II. Grands principes de prise en charge du CBNPC .....</b>	<b>23</b>
1. Recherche d'addictions oncogéniques .....	24
2. Évaluation des contre-indications à l'immunothérapie .....	24
3. Options thérapeutiques selon le niveau d'expression du PD-L1 .....	24
4. Efficacité de l'immunothérapie dans le traitement du CBNPC .....	25
4.1. Stades métastatiques .....	26
4.1.1. IO seule en 1ère ligne métastatique .....	26
4.1.2. CT-IO en 1ere ligne métastatique .....	26
4.2. Stades localement avancés.....	27
4.3. Stades précoces.....	28
5. PD-L1 comme biomarqueur de réponse à l'immunothérapie.....	29
<b>III. Principes de l'immunothérapie et mécanismes d'action .....</b>	<b>30</b>
1. Les étapes clés de la réponse immunitaire antitumorale .....	30
2. Voies de signalisation du PD-L1.....	32
3. Principaux facteurs de résistance primaire à l'immunothérapie.....	32
3.1. Charge Mutationnelle Tumorale (TMB).....	33
3.2. Infiltration des Cellules T Effectrices .....	34
3.3. Altérations des voies de signalisation cellulaire.....	35
3.3.1. Altération de la voie de PTEN.....	35
3.3.2. Altération de la voie de l'IFN $\gamma$ .....	35
3.4. Modulation épigénétique .....	36
4. Facteurs connus de résistance secondaires à l'immunothérapie.....	37
4.1. Modification d'expression de PD-L1 .....	37
4.2. Épuisement des Cellules T.....	37
4.3. Modification du profil génomique.....	39
<b>IV. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et cancer bronchique .....</b>	<b>41</b>
1. Définition de la TEM.....	41

2.	TEM dans le processus métastatique .....	44
3.	Acteurs de la TEM.....	45
4.	Les principales voies de signalisations impliquées dans la TEM.....	45
5.	VIM, comme marqueur canonique de TEM.....	47
6.	AXL, comme co-marqueur de TEM et cible d'intérêt .....	48
6.1.	Structure moléculaire de AXL .....	48
6.2.	Voies de signalisation médiées par AXL .....	49
6.3.	AXL dans le CBNPC .....	50
6.4.	AXL comme cible thérapeutique.....	50
7.	Rôle de la TEM et AXL dans la réponse à l'immunothérapie .....	51
	OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	55
	<b>I. Hypothèses de recherche et questions posées.....</b>	<b>55</b>
	<b>II. Objectifs de l'étude.....</b>	<b>55</b>
	RESULTATS .....	56
	<b>I. Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse associés à un profil immunitaire dans le CBNPC localisé .....</b>	<b>56</b>
	1. Résumé .....	56
	2. Article scientifique.....	59
	<b>II. AXL comme biomarqueur prédictif de la résistance à l'immunothérapie dans le cancer bronchique non à petites cellules métastatique .....</b>	<b>86</b>
	1. Résumé .....	86
	2. Article scientifique.....	88
	DISCUSSION - CONCLUSION .....	111
	PERSPECTIVES.....	117
	1. Intérêt de AXL dans le CBNPC : point de vue clinique .....	117
	2. Intérêt de AXL dans le CBNPC : point de vue biologique.....	119
	2.1. Evaluation d'AXL dans une cohorte de CBNPC localisés.....	119
	2.2. Evaluation de la résistance dans un modèle de culture <i>ex-vivo</i> par la méthode « <i>Patient Derived Explant</i> » (PDE) .....	121
	CONCLUSION GENERALE .....	126
	BIBLIOGRAPHIE .....	127

## ABRÉVIATIONS

- **AUC** : Area Under the Curve
- **ALK** : Anaplastic Lymphoma Kinase
- **AXL** : Axl Receptor Tyrosine Kinase
- **ASCO** : American Society of Clinical Oncology
- **APC** : Antigen-Presenting Cell
- **ARNm** : Acide Ribonucléique Messenger
- **B2M** : Bêta-2-microglobuline
- **BRAF** : Proto-oncogène B-Raf
- **CD3** : Cluster de différenciation 3
- **CD8** : Cluster de différenciation 8
- **CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- **CRB** : Centre de Ressources Biologiques
- **CBNPC** : Cancer Broncho-Pulmonaire Non à Petites Cellules
- **CBPC** : Cancer bronchique à petites cellules
- **CT** : Chimiothérapie
- **CRT** : Chimiothérapie-Radiothérapie
- **CTLA4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
- **CCL2** : Chemokine (C-C motif) ligand 2
- **DAPI** : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- **DC** : Dendritic Cells
- **ECOG** : Eastern Cooperative Oncology Group
- **EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor
- **EFS** : Event-Free Survival
- **ESMO** : European Society for Medical Oncology
- **EVOC** : Ex-Vivo Organoid Culture
- **FDA** : Food and Drug Administration
- **FOXP3** : Forkhead Box P3
- **FDG** : Fluorodésoxyglucose
- **GRB2** : Growth Factor Receptor Bound Protein 2
- **Gas6** : Growth Arrest-Specific 6
- **HLA** : Human Leukocyte Antigen
- **HIF1** : Hypoxia-Inducible Factor 1
- **HIF2** : Hypoxia-Inducible Factor 2
- **HR** : Hazard Ratio
- **ICAM1** : Intercellular Adhesion Molecule 1
- **ICI** : Immune Checkpoint Inhibitors
- **IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma
- **ITK** : Inhibiteurs de tyrosine kinase
- **IV** : Intraveineuse
- **JAK** : Janus Kinase
- **Ki67** : Marqueur de prolifération cellulaire
- **KRAS** : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

- **LAG3** : Lymphocyte-Activation Gene 3
- **LUAD** : Lung Adenocarcinoma
- **LUSC** : Lung Squamous Cell Carcinoma
- **LCN2** : Lipocalin 2
- **MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase
- **MET** : Mesenchymal-Epithelial Transition
- **MDSC** : Myeloid-Derived Suppressor Cells
- **mTOR** : Mechanistic Target of Rapamycin
- **NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor Kappa
- **NK** : Natural Killer
- **NCCN** : National Comprehensive Cancer Network
- **NTRK1-3** : Neutrophilic Tyrosine Receptor Kinase 1-3
- **PD-1** : Programmed Death-1
- **PD-L1** : Programmed Death-Ligand 1
- **PFS** : Progression-Free Survival
- **PDE** : Patient Derived Explant
- **PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase
- **PTEN** : Phosphatase and Tensin Homolog
- **PROS1** : Protéine S
- **ROS1** : c-ros Oncogene 1
- **R0** : Résection complète de la tumeur avec marges microscopiquement saines
- **STAT1** : Signal Transducer and Activator of Transcription 1
- **STK11** : Serine/Threonine Kinase 11
- **SMAD** : Small Mothers Against Decapentaplegic
- **STATs** : Signal Transducers and Activators of Transcription
- **SRC** : Src Family Tyrosine Kinase Protein
- **TEM** : Transition épithélio-mésenchymateuse
- **TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor Beta
- **TCR** : T-Cell Receptor
- **TAM** : Tyro3, Axl, Mertk
- **TMB** : Tumor Mutational Burden
- **TPS** : Tumor Proportion Score
- **TIDE** : Tumor Immune Dysfunction and Exclusion
- **TNF** : Tumor Necrosis Factor
- **ULBP1** : UL16 Binding Protein 1
- **VIM** : Vimentin
- **ZEB1** : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
- **ZEB2** : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### Publications scientifiques

**AXL and vimentin as surrogates for epithelial-mesenchymal transition to predict immunotherapy sensitivity in localized NSCLC**

*Ancel J, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Dormoy V, Durlach A, Deslee G, Gilles C and Polette M.*

*In submission*

\*

**AXL expression to predict resistance to immunotherapy in metastatic non-small cell lung cancer**

*Ancel J, Dewolf M, Nawrocki-Raby B, Durlach A, Dalstein V, Lalun N, Dormoy V, Deslee G, Gilles C and Polette M*

*In submission*

\*

**Soluble biomarkers to predict clinical outcomes in non-small cell lung cancer treated by immune checkpoints inhibitors.**

*Ancel J, Dormoy V, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Durlach A, Dewolf M, Gilles C, Polette M and Deslee G.*

**Frontiers In Immunology, 2023 [14 :1171649]**

\*

**Transcriptomic FHIT low /pHER2 high signature as a predictive factor of outcome and immunotherapy response in non-small cell lung cancer.**

*Brisebarre A, Ancel J, Ponchel T, Loeffler E, Germain A, Dalstein V, Dormoy V, Durlach A, Delepine G, Deslée G, Polette M and Nawrocki-Raby B.*

**Frontiers In Immunology, 2022 [13 :1058531].**

\*\*\*

### Communications par voie d'affiche

**La transition épithélio-mésenchymateuse comme biomarqueurs prédictifs de résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire dans le cancer bronchique non à petites cellules**

*Ancel J, Dewolf M, Durlach A, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Deslee G, Gilles C, and Polette M and.*

*Journées de Recherche Respiratoire (J2R), Caveau CASTELNAU, Reims, France (Octobre 2022)*

\*

**Epithelial to mesenchymal transition to predict immune resistance in non-small cell lung cancer.**

*Ancel J, Dewolf M, Durlach A, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Deslee G, Gilles C, and Polette M and.*

*10<sup>th</sup> International Meeting on EMT (TEMTIA), Curie University, Paris, France (Novembre 2022)*

\*

**Epithelial-to-mesenchymal signature as independent predicting factor of survival in surgically resected non-small cell lung cancer.**

*Ancel J, Dewolf M, Durlach A, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Deslee G, Gilles C, and Polette M and.*

*9.5<sup>th</sup> International Meeting on EMT (TEMTIA), Digital conference (Novembre 2021)*

\*\*\*

#### **Communications orales**

**La transition épithélio-mésenchymateuse comme biomarqueurs prédictifs de résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire dans le cancer bronchique non à petites cellules**

*Ancel J, Dewolf M, Durlach A, Nawrocki-Raby B, Dalstein V, Deslee G, Gilles C, and Polette M and.*

*Journées de Recherche Respiratoire (J2R), Caveau CASTELNAU, Reims, France (Octobre 2022)*

\*\*\*

#### **Distinctions scientifiques**

**Bourse FRFT – Doc INSERM « Soutien pour la formation à la recherche fondamentale et translationnelle en Cancérologie »**

\*

**Lauréat du 4e Appel à Projets Fonds Amgen France – Thématique 1 : Recherche fondamentale - Axe de recherche 1 - Onco-hématologie : Biomarqueurs : prédire l'efficacité ou la toxicité des traitements en onco-hématologie**

\*

**Appel à projet SFR Cap Santé, projet TEPIimmunEMT**

\*\*\*

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Incidence mondiale standardisée à l'âge du cancer bronchique en 2022.....	15
<b>Figure 2</b> : Taux de mortalité pour 100 000 personnes, standardisée à l'âge du cancer bronchique en 2022 selon le sexe et par région géographique.....	15
<b>Figure 3</b> : Estimation de l'évolution mondiale du nombre de nouveaux cas de cancer bronchique entre 2022 et 2045 .....	16
<b>Figure 4</b> : Évolution de l'identification des addictions oncogéniques et des thérapies ciblées existantes dans le traitement du CBNPC avancé.....	19
<b>Figure 5</b> : Répartition des altérations moléculaires dans le CBNPC.....	20
<b>Figure 6</b> : 8ème classification TNM du cancer du poumon .....	22
<b>Figure 7</b> : Taux de survie globale à 5 ans par stade pour les patients opérés d'un CBNPC....	23
<b>Figure 8</b> : Évaluation de la résecabilité d'un CBNPC selon le stade avec intégration d'un potentiel traitement systémique dans une démarche à prétention curative .....	23
<b>Figure 9</b> : Synthèse des facteurs à prendre en compte pour adapter la prise en charge d'un patient porteur d'une CBNPC de stade IV .....	25
<b>Figure 10</b> : Données de survie globale (OS) et de survie sans progression (PFS) actualisées à 5 ans d'après l'étude PACIFIC.....	27
<b>Figure 11</b> : Principaux résultats positifs démontrant un bénéfice de la chimio-immunothérapie en péri-opératoire .....	28
<b>Figure 12</b> : Efficacité du Cemiplimab selon le taux d'expression du PD-L1 dans une population de patients sélectionnés sur le PD-L1.....	29
<b>Figure 13</b> : Le cycle de l'immunité antitumorale.....	31
<b>Figure 14</b> : Le cycle de l'immunité antitumorale et ses principaux facteurs stimulants et inhibiteurs.....	31
<b>Figure 15</b> : Taux de réponses aux anti-PD-1 selon la charge mutationnelle tumorale par type histologique de cancer.....	33
<b>Figure 16</b> : Illustration du continuum tumoral immunitaire.....	34
<b>Figure 17</b> : Voie de signalisation de l'IFN $\gamma$ .....	35
<b>Figure 18</b> : Principaux effets liés à l'IFN $\gamma$ et aux inhibiteurs de checkpoint immunitaire dans les cellules tumorales et cellules dendritiques.....	36
<b>Figure 19</b> : Principaux mécanismes impliqués différemment ou conjointement dans les résistances dites primaires ou secondaires à l'immunothérapie .....	37
<b>Figure 20</b> : Instauration de cellules T épuisées dans les tumeurs solides persistantes .....	39
<b>Figure 21</b> : Taux de mutations acquises au moment de la résistance à l'immunothérapie (anti-PD-(L)1) +/- chimiothérapie, la chimiothérapie seule, et thérapie ciblée .....	40
<b>Figure 22</b> : Potentiel synergisme des mécanismes de résistance à l'immunothérapie .....	41

<b>Figure 23 :</b> Illustration des différents états partiels et extrêmes de transition épithélio-mésenchymateuse.....	43
<b>Figure 24 :</b> Implication de la TEM dans les différentes étapes de la progression métastatique. ....	45
<b>Figure 25 :</b> Principales voies de signalisation participant au programme de TEM.....	46
<b>Figure 26 :</b> Représentation d'un programme de TEM avec ses principaux marqueurs selon le phénotype cellulaire .....	48
<b>Figure 27 :</b> Principaux ligands et récepteurs de la famille de TAM.....	49
<b>Figure 28 :</b> Récepteurs de la famille TAM et leurs principaux inhibiteurs de type ITK ou anticorps bloquants.....	51
<b>Figure 29 :</b> Modification du microenvironnement immunitaire lors d'une TEM.....	52
<b>Figure 30 :</b> Graphical abstract .....	58
<b>Figure 31 :</b> Principaux résultats de l'étude de phase 2 TRAILBLAZER, évaluant le SHR-1701 .....	114
<b>Figure 32 :</b> Proposition de design d'une étude observationnelle multicentrique pour confirmer l'intérêt de AXL pour prédire la réponse à l'immunothérapie .....	117
<b>Figure 33 :</b> Proposition de design d'une étude interventionnelle de phase 2 en cas de PD-L1 $\geq$ 50% et expression d'AXL ( $\geq$ 1%) évaluant l'intérêt d'un inhibiteur d'AXL en combinaison à une immunothérapie seule de 1ère ligne .....	118
<b>Figure 34 :</b> Proposition de design d'une étude interventionnelle de phase 2 en cas d'expression de AXL ( $\geq$ 1%), évaluant l'intérêt d'un inhibiteur d'AXL en combinaison à une chimio-immunothérapie seule de 1ère ligne.....	118
<b>Figure 35 :</b> AXL est associé à des caractéristiques de tumeurs mésenchymateuses. ....	120
<b>Figure 36 :</b> Illustration d'une zone intra-tumorale et péri-tumorale avec marquages nucléaire (DAPI), CD3 et CD8 et après segmentation par CellProfiler .....	121
<b>Figure 37 :</b> Evaluation de la réponse antitumorale sur modèle de culture par PDE .....	123

## LISTE DES TABLEAUX

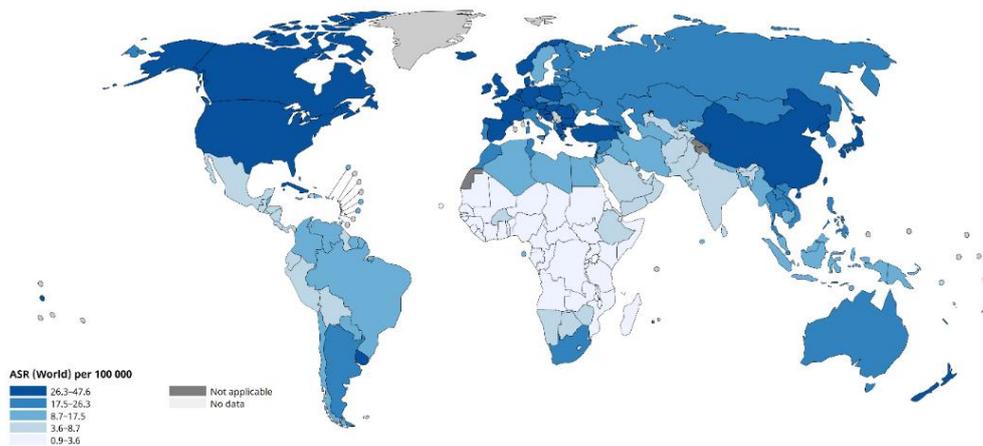
<b>Tableau 1 :</b> Données d'activités cliniques de l'immunothérapie en 1 <sup>ère</sup> ligne, en cas d'expression de PD-L1 $\geq$ 50% .....	26
<b>Tableau 2 :</b> Données d'activités cliniques de l'immunothérapie en 1 <sup>ère</sup> ligne, indépendamment de l'expression de PD-L1 .....	26
<b>Tableau 3 :</b> Caractéristiques principales des 95 CBNPC inclus dans l'évaluation d'AXL... ..	119
<b>Tableau 4 :</b> Caractéristiques principales des 20 CBNPC inclus dans le modèle de culture « <i>PDE</i> » .....	122

# INTRODUCTION

## I. Les cancers broncho-pulmonaires

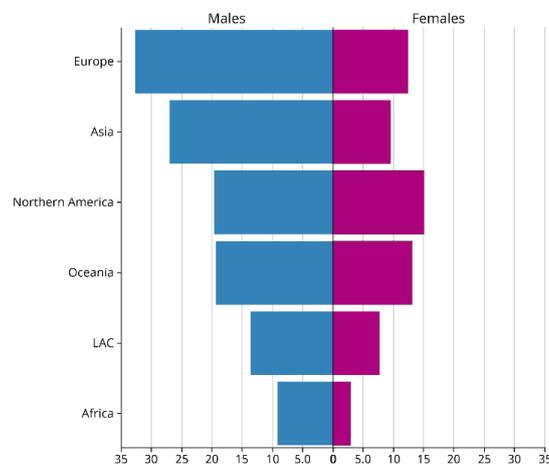
### 1. Épidémiologie

Le cancer du poumon est une maladie majeure à l'échelle mondiale, caractérisée par une incidence croissante et un taux de mortalité élevé. En 2022, environ 2,5 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués, représentant 11,4% de tous les nouveaux cas de cancer dans le monde (figure 1) [1].



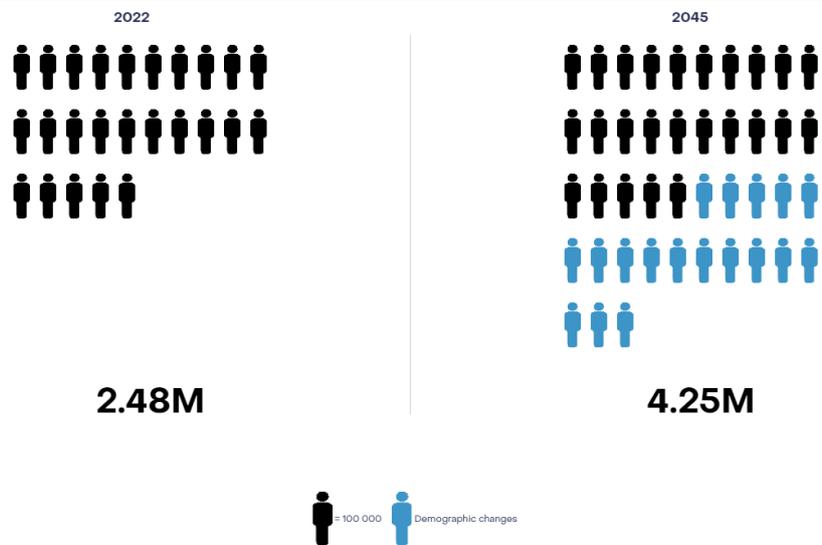
**Figure 1 :** Incidence mondiale standardisée à l'âge du cancer bronchique en 2022 (d'après <https://gco.iarc.who.int/today>)

L'incidence standardisée par âge était de 29,4 pour 100 000 personnes, plaçant le cancer du poumon au troisième rang derrière le cancer du sein (46,8) et le cancer de la prostate (29,4). Chez l'homme, l'incidence standardisée par âge était beaucoup plus élevée, s'établissant à 32,1, tandis que cette même incidence ne dépassait pas les 16,2 chez les femmes, soulignant une forte prédominance masculine (figure 2).



**Figure 2 :** Taux de mortalité pour 100 000 personnes, standardisée à l'âge du cancer bronchique en 2022 selon le sexe et par région géographique d'après <https://gco.iarc.who.int/today>

En termes de mortalité, le cancer du poumon est responsable de près de 1,8 million de décès chaque année, représentant 18% de tous les décès attribués au cancer. En Europe, les taux de mortalité standardisés par l'âge étaient particulièrement élevés en 2022, atteignant respectivement pour les hommes et les femmes 32,6 et 12,4 (figure 3). L'Europe continue de faire face à une mortalité importante liée au cancer du poumon malgré les efforts déployés pour améliorer la prévention et le traitement.



**Figure 3 :** Estimation de l'évolution mondiale du nombre de nouveaux cas de cancer bronchique entre 2022 et 2045 d'après <https://gco.iarc.who.int/today>

Les projections pour l'avenir sont inquiétantes, avec une prévision de croissance des cas de cancer du poumon à 4,25 millions d'ici 2045. Cette prévision d'augmentation est en partie attribuable aux tendances de consommation de tabac, un facteur de risque majeur, ainsi qu'à l'exposition croissante à la pollution atmosphérique ou encore à d'autres agents carcinogènes environnementaux voire professionnels [2]. Ces données soulignent l'urgence d'initiatives globales visant à réduire les comportements à risque, à promouvoir le dépistage précoce et à développer de nouvelles thérapies pour contrôler cette épidémie croissante de cancer du poumon.

## 2. Classifications du cancer bronchique

### 2.1. Classification histologique

La classification histologique du cancer bronchique, actuellement définie par la classification OMS de 2021, est essentielle pour le diagnostic et le traitement [3]. Parmi les différentes catégories, on distingue principalement les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC).

Les CBPC, qui représentent environ 15% des cancers bronchiques, se caractérisent par des cellules de petite taille, à noyau hyperchromatique, et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Ces cancers sont fortement liés au tabagisme et sont connus pour leur croissance rapide et leur potentiel métastatique précoce [4]. Cependant, les CBPC ne seront pas davantage abordés dans ce manuscrit, qui se restreindra aux CBNPC.

Les CBNPC, représentant quant à eux environ 85% des cas de cancer bronchique, se subdivisent en plusieurs types histologiques principaux :

- 1) **Adénocarcinome** : C'est le type le plus courant, représentant environ 40% des CBNPC. Il se développe généralement au dépend des cellules glandulaires des alvéoles et est plus souvent localisé en périphérie des poumons [5]. Histologiquement, les adénocarcinomes sont le plus souvent invasif avec des subdivisions comprenant :
  - a) **Adénocarcinome acinaire** : Caractérisé par des structures glandulaires bien définies.
  - b) **Adénocarcinome (micro-)papillaire** : Présentant des papilles avec un axe fibrovasculaire central.
  - c) **Adénocarcinome mucineux** : Caractérisé par une production abondante de mucine.
  - d) **Adénocarcinome solide** : Présentant des amas solides de cellules avec présence de mucine intracytoplasmique.
  - e) **Adénocarcinome lépidique** : Se développant le long des structures alvéolaires préexistantes sans destruction de l'architecture alvéolaire.
- 2) **Carcinome épidermoïde** (ou carcinome malpighien) : Constituant environ 25 à 30% des CBNPC, il se développe à partir des cellules épithéliales de revêtement des bronches au décours d'une dysplasie et métaplasie malpighienne. Il se caractérise histologiquement par la présence de kératinisation et de ponts intercellulaires [6]. Les sous-types histologiques comprennent :
  - a) **Carcinome épidermoïde kératinisant** : Présentant une accumulation de kératine et une différenciation squameuse marquée.
  - b) **Carcinome épidermoïde non kératinisant** : N'ayant que peu ou pas de dépôts de kératine.
  - c) **Carcinome épidermoïde basaloïde** : caractérisé par la présence de petites cellules basaloïdes avec une différenciation squameuse limitée.
- 3) **Carcinome à grandes cellules** : Représentant environ 10-15% des CBNPC, ce type de CBNPC est caractérisé par de grandes cellules anaplasiques sans différenciation glandulaire ou squameuse. Histologiquement, on observe de grandes cellules avec un cytoplasme abondant et des noyaux vésiculaires proéminents [7].
- 4) **Carcinome adénosquameux** : C'est un type mixte qui présente à la fois des caractéristiques d'adénocarcinome et de carcinome épidermoïde. Il est relativement rare et montre des zones distinctes des deux types histologiques dans la même tumeur [8].
- 5) **Carcinomes sarcomatoïdes** : Ils constituent une catégorie rare et agressive des CBNPC. Ces tumeurs sont caractérisées par des éléments épithéliaux et mésenchymateux, suggérant une différenciation biphasique [9]. Histologiquement, les carcinomes sarcomatoïdes se subdivisent en plusieurs sous-types :
  - a) **Carcinome pléomorphe** : Ce sous-type est composé de cellules épithéliales peu différenciées et de cellules fusiformes ou géantes. Les cellules montrent une grande variabilité morphologique (qualifiée de pléomorphisme) avec des atypies et une activité mitotique souvent marquées.
    - i) **Carcinome à cellules fusiformes** : Il se caractérise par la prédominance de cellules fusiformes rappelant la morphologie observée dans certains sarcomes. Ses cellules sont allongées et montrent un agencement fusiforme évocateur.

- ii) **Carcinome à cellules géantes** : Ce sous-type est dominé par de grandes cellules anaplasiques, géantes, souvent multinucléées, et avec un cytoplasme abondant.
- b) **Carcinosarcome** : il présente des composantes carcinomateuses et sarcomateuses distinctes, incluant souvent des éléments de carcinome épidermoïde ou d'adénocarcinome associés à des composantes sarcomateuses empruntées aux ostéosarcome, chondrosarcome ou rhabdomyosarcome.
- c) **Blastome pulmonaire** : Très rare, ce sous-type est caractérisé par une combinaison de cellules épithéliales et mésenchymateuses immatures, ressemblant aux tumeurs embryonnaires.

Ces carcinomes sarcomatoïdes représentent un défi diagnostique et thérapeutique en raison de leur rareté et de leur nature agressive. La reconnaissance de ces sous-types histologiques est cruciale pour le développement de stratégies thérapeutiques adaptées et pour établir un pronostic précis. Ce sous-type histologique est d'ailleurs régulièrement proposé comme étant une représentation typique d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en cancérologie thoracique [10], ce qui sera un point d'intérêt majeur détaillé ultérieurement dans ce manuscrit.

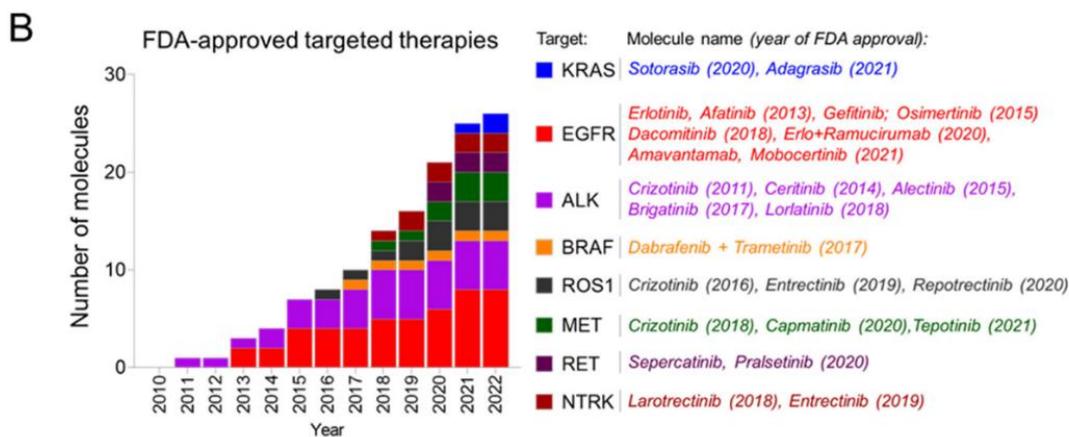
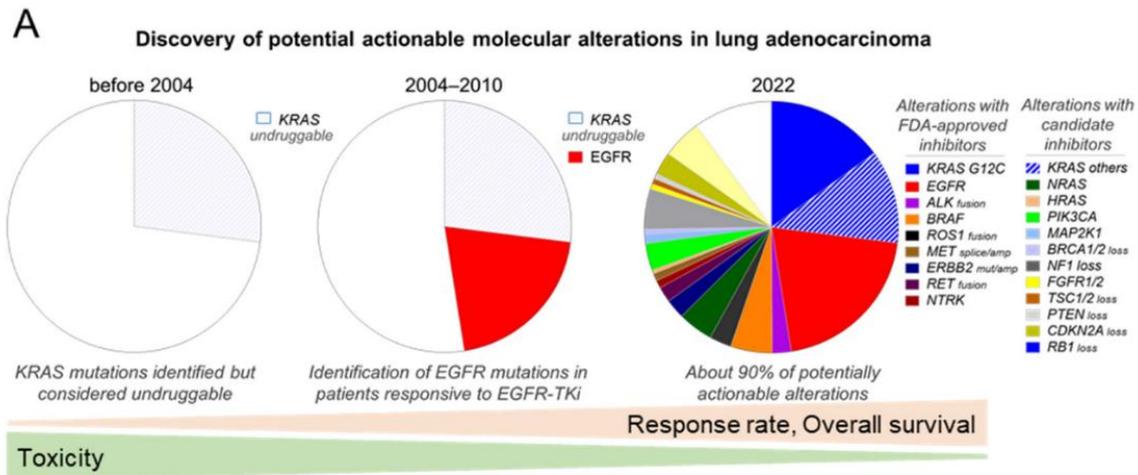
Cette classification histologique du cancer bronchique est en tout cas essentielle pour orienter le choix thérapeutique et établir le pronostic, avec des distinctions nettes entre les sous-types basés sur les caractéristiques morphologiques des cellules tumorales. Une seconde classification, cette fois-ci moléculaire, a quant à elle bouleversé, les pratiques cliniques en cancérologie thoracique et notamment dans le cadre des CBNPC non-épidermoïdes.

## 2.2. Classification moléculaire

Cette classification moléculaire était disponible antérieurement dans la classification de l'OMS de 2015 (quatrième édition) dans la section "Génétique somatique". Dans la classification de l'OMS de 2021 ces anomalies moléculaires sont intégrées dans les sections "Étiologie", "Pathogénèse" et "Pathologie moléculaire diagnostique". De nombreuses modifications moléculaires ont ainsi été rapportées et sont désormais associées à la pathogénèse, à la progression et, de manière significative d'un point de vue clinique, au traitement des CBNPC qui en sont porteurs.

La caractérisation moléculaire de l'adénocarcinome pulmonaire permet ainsi d'identifier des mutations somatiques qui sont pour certaines qualifiées d'addiction oncogéniques ciblables lorsque des thérapeutiques sont disponibles en clinique. Par exemple, les délétions de l'exon 19 et les mutations ponctuelles de l'exon 21 du gène EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ainsi que les réarrangements du gène ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), sont relativement propres à l'adénocarcinome pulmonaire et sont associées à plusieurs thérapeutiques dites ciblées sous la forme d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs). Les altérations ciblables avec des molécules approuvées incluent des mutations (ponctuelles, délétions, ...) et des translocations dans des gènes tels que EGFR, ALK, BRAF (B-raf-*proto oncogene*), RET, NTRK1-3 (Neutrophilic Tyrosine Receptor Kinase), ROS1, KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) G12C et MET (figure 4) [11,12]. Bien que ces altérations soient généralement

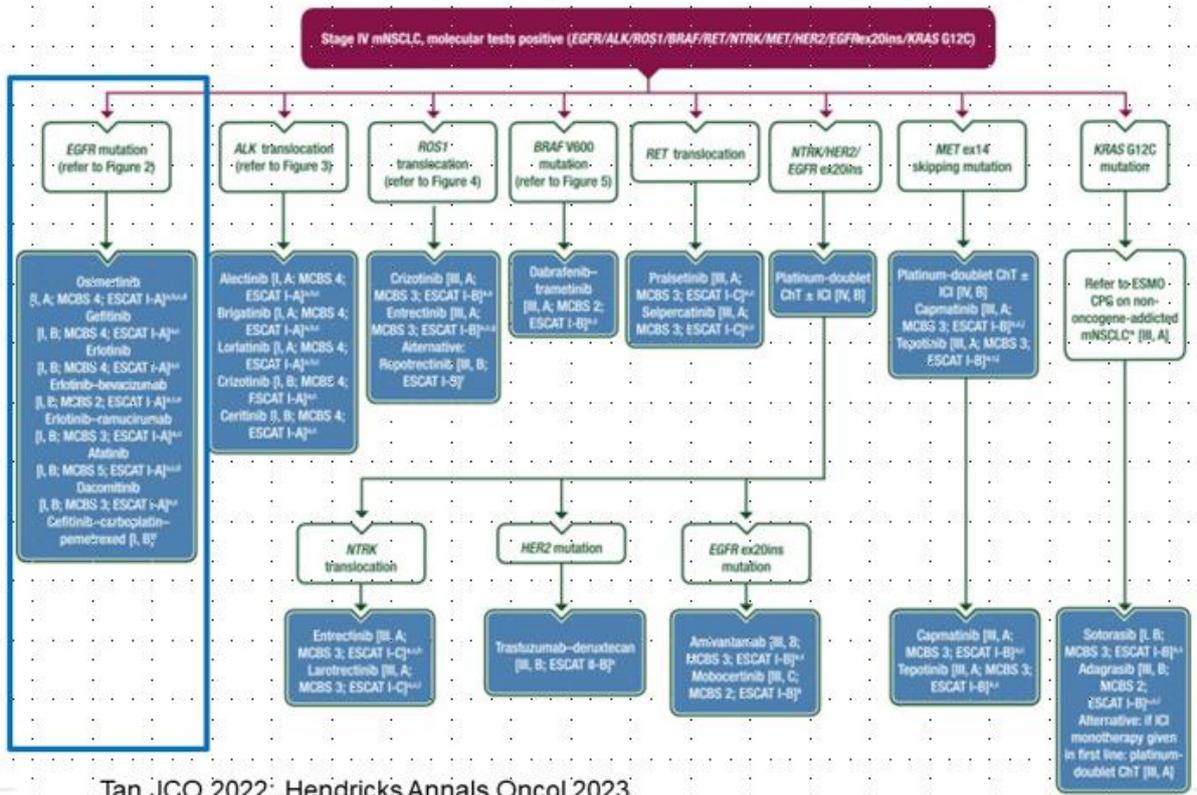
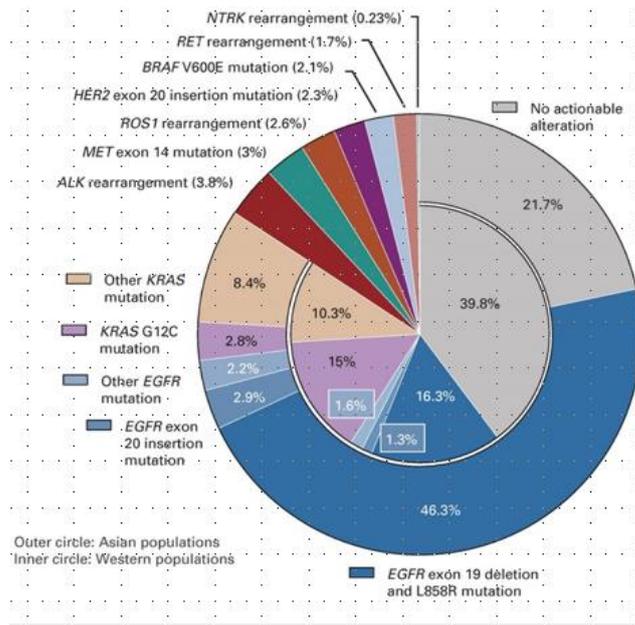
utilisées pour guider le traitement des patients à différents stades avancés de la maladie, les indications de traitements ciblant EGFR et même ALK s'étendent de plus en plus aux patients à un stade localement avancé et même précoces en péri-opératoire [13–15].



**Figure 4 :** Évolution de l'identification d'addictions oncogéniques et des thérapies ciblées existantes dans le traitement du CBNPC avancé. (A) La découverte d'addictions oncogéniques dans le CBNPC a conduit au développement d'une médecine personnalisée, améliorant ainsi la prise en charge et la survie des patients. (B) Evolution croissante du nombre de médicaments approuvés par la FDA pour le traitement du CBNPC avec addiction oncogénique ciblables. D'après Delahaye et al., *Cancers* 2022 [16]

D'autres altérations, telles que TP53, STK11 et KEAP1, peuvent être retrouvées dans les adénocarcinomes pulmonaires, seules ou en combinaison avec d'autres mutations. Ces altérations ne sont pas actuellement directement ciblables mais peuvent être associées à la progression tumorale et à la résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, particulièrement pour STK11 [17,18]. L'évaluation des tumeurs pour les altérations cliniquement pertinentes est listée comme un critère souhaitable dans cette classification de l'OMS 2021, soulignant son intégration croissante dans la classification histo-moléculaire des CBNPC.

La fréquence de ces altérations dans l'adénocarcinome pulmonaire a été étudiée en fonction du sexe, de l'âge, du statut tabagique et des régions géographiques (figure 5).



Tan JCO 2022; Hendricks Annals Oncol 2023

**Figure 5 :** Répartition des altérations moléculaires dans le CBNPC (figure supérieure) en population d'origine asiatique (cercle extérieur) et en population d'origine caucasienne (cercle intérieur). Algorithme décisionnel proposant chaque molécule selon le profil moléculaire d'après les recommandations de la société européenne d'oncologie médicale (ESMO) (diagramme inférieur). D'après Tan et al. JCO 2022 [11] et Hendricks et al. Annal Oncol 2023 [19].

Les mutations KRAS sont fréquemment retrouvées chez les fumeurs [20], tandis que les mutations EGFR et les translocations ALK, ROS1 et RET sont plus susceptibles d'être identifiées chez les non-fumeurs ou fumeurs au faible tabagisme. D'autres altérations comme

TP53, NRAS et MAP2K1 sont également plus courantes chez les fumeurs ; les mutations BRAF et MET se retrouvent aussi bien chez les fumeurs que chez les non-fumeurs ; les altérations de l'EGFR sont plus souvent observées chez les jeunes patients et les femmes, tandis que les altérations ALK, ROS1 et RET sont plus courantes chez les patients plus jeunes patients sans nette prédominance de genre [21]. De plus, il est évident que la mutation EGFR est plus fréquente pour les patients d'origine asiatique, tandis que la mutation KRAS est plus courante dans les populations d'origine caucasienne. D'autres altérations présentent également des fréquences différentes selon les régions géographiques, tandis que certaines ne semblent pas varier géographiquement. Il est reconnu que ces associations épidémiologiques ne sont pas absolues et ne doivent donc pas déterminer de manière exclusive les analyses de biologie moléculaire [22].

Les classifications histologiques et désormais moléculaires sont très informatives mais ne peuvent se suffire à elle-même. Il reste nécessaire de prendre en compte l'étendue de la pathologie tumorale, ce qui est pris en considération dans la classification clinique.

### 2.3. Classification clinique

La stadification clinique du CBNPC est cruciale pour évaluer l'étendue de la maladie au moment du diagnostic et pour déterminer le traitement approprié selon les données des essais cliniques. Le bilan d'extension initial doit inclure un scanner thoraco-abdomino-pelvien (TAP), qui permet une évaluation détaillée du thorax, de l'abdomen et du pelvis pour détecter d'éventuelles métastases.

En l'absence de preuves métastatiques évidentes, le bilan d'extension est complété par un TEP au FDG (tomographie par émission de positons au 18-fluorodésoxyglucose). Le TEP au FDG est une technique d'imagerie fonctionnelle qui utilise un traceur pour identifier les zones de forte activité métabolique, souvent indicative de cellules tumorales actives. Cela permet de détecter des métastases occultes non visibles sur certains scanner TAP.

En plus de ces examens, une imagerie cérébrale, soit par scanner soit par IRM (préférée en raison de sa sensibilité supérieure), est nécessaire pour exclure la présence de métastases cérébrales, particulièrement chez les patients présentant des symptômes neurologiques ou lorsque la maladie est à un stade avancé.

Ces examens combinés permettent une évaluation complète de l'extension tumorale au moment du diagnostic. La classification tumorale est ensuite réalisée selon le système TNM de la 8<sup>e</sup> édition de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) [23], qui évalue la tumeur (T), les ganglions lymphatiques (N) et les métastases (M) :

- **T (Tumor)** : Évalue la taille et l'extension de la tumeur primaire.
  - T1 : Tumeur  $\leq 3$  cm, confinée au poumon.
  - T2 : Tumeur  $> 3$  cm mais  $\leq 5$  cm, ou envahissement de structures adjacentes.
  - T3 : Tumeur  $> 5$  cm mais  $\leq 7$  cm, ou envahissement des structures environnantes.
  - T4 : Tumeur  $> 7$  cm ou envahissement de structures vitales.

- **N (Nodes)** : Évalue l'implication des ganglions lymphatiques régionaux.
  - N0 : Pas d'implication des ganglions lymphatiques.
  - N1 : Métastases dans les ganglions intrapulmonaires ou hilaires homolatéraux.
  - N2 : Métastases dans les ganglions médiastinaux ipsilatéraux ou sous-carénaux.
  - N3 : Métastases dans les ganglions médiastinaux ou hilaires controlatéraux, ou dans les ganglions scalènes ou supra claviculaires.
- **M (Metastasis)** : Évalue la présence de métastases à distance.
  - M0 : Pas de métastases à distance.
  - M1 : Présence de métastases à distance (M1a : métastases pleurales ou péricardiques, M1b : une métastase unique dans un organe, M1c : multiples métastases dans un ou plusieurs organes).

Cette classification TNM permet de regrouper les cancers bronchiques non à petites cellules en quatre stades cliniques (figure 6) :

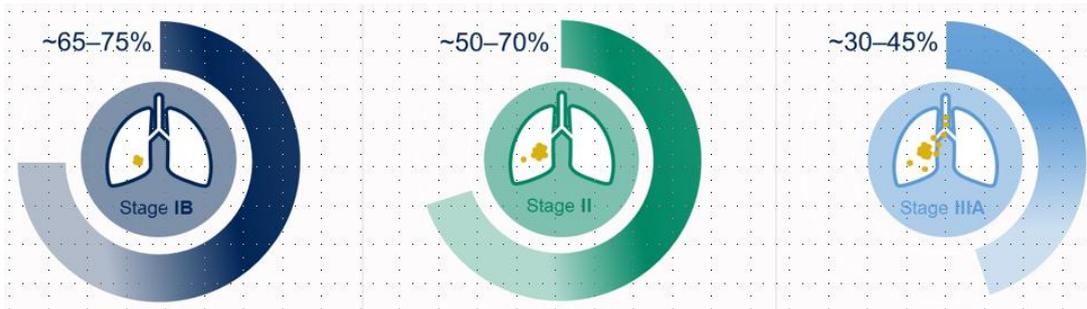
- **Stade I** : Tumeur confinée au poumon sans atteinte ganglionnaire (T1-2, N0, M0).
- **Stade II** : Tumeur avec envahissement limité des ganglions lymphatiques intrapulmonaires ou hilaires (T1-2, N1, M0) ou tumeur plus avancée mais sans atteinte ganglionnaire (T3-4, N0, M0).
- **Stade III** : Tumeur avec implication plus étendue des ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux ou sous-carénaux (T1-4, N2, M0) ou ganglions controlatéraux ou supra claviculaires (T1-4, N3, M0).
- **Stade IV** : Présence de métastases à distance (T1-4, N0-3, M1a-c).

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

**Figure 6** : 8ème classification TNM du cancer du poumon [23].

Cette stadification est essentielle, déterminant le pronostic des patients et orientant la prise en charge thérapeutique, pouvant aller de la chirurgie curative pour les stades précoces à la radiothérapie ou aux thérapies systémiques exclusives pour les stades plus avancés.

Le pronostic peut ainsi varier fortement entre les différents stades précédemment définis allant à plus de 75% de survie à 5 ans pour les stades I opérés mais chutant à moins de 30% pour les stades localement avancés pourtant non-métastatiques au diagnostic (figure 7).



**Figure 7 :** Taux de survie globale à 5 ans par stade pour les patients opérés d'un CBNPC. D'après Herbst (ASCO23).

La résecabilité se discute ainsi lors de RCP avec des recommandations émanant notamment de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network®) comme illustré ci-dessous (figure 8) [24].

	IA <i>Resection alone Consider Sub-lobar Resection</i>	Resectable IB, II and IIIA <i>Surgery ± (neo)adjuvant cancer immunotherapy or targeted therapy ± chemotherapy ± RT</i>	Unresectable IIIB/C <i>Chemotherapy/RT ± cancer immunotherapy or targeted therapy</i>	
<b>T and N</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
<b>T1</b>	IA	IIA	IIIA	IIIB
<b>T2a/b</b>	IB   IIA	IIA/IIIB	IIIA	IIIB
<b>T3</b>	IIB	IIIA	IIIA	IIIC
<b>T4</b>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
<b>M1a/b/c</b>	IVA/B/C	IVA/B/C	IVA/B/C	IVA/B/C
	IVA/B/C <i>Systemic therapy: cancer immunotherapy; targeted therapy; chemotherapy</i>			

**Figure 8 :** Évaluation de la résecabilité d'un CBNPC selon le stade avec intégration d'un potentiel traitement systémique dans une démarche à prétention curative. D'après Herbst (ASCO23).

Plus récemment, les traitements systémiques ont démontré des bénéfices en termes de survie sans récurrence et même de survie globale pour certains d'entre eux. C'est notamment le cas pour l'immunothérapie qui s'impose dans la plupart des stades, y compris non-métastatiques de CBNPC.

## II. Grands principes de prise en charge du CBNPC

La prise en charge des cancers bronchiques non-à petites cellules s'articule autour de plusieurs axes clés, incluant la recherche d'addictions oncogéniques (si indiqué), l'évaluation des contre-indications à l'immunothérapie et la prise en compte du niveau d'expression de PD-L1 (Programmed Death Ligand 1).

## 1. Recherche d'addictions oncogéniques

La première étape consiste en la recherche d'addictions oncogéniques (comme décrit précédemment), processus essentiel dans la gestion des adénocarcinomes pulmonaires. Cette démarche vise à identifier des mutations ou altérations somatiques de l'ADN tumoral qui peuvent être ciblées par des thérapies ciblées. Dans le cadre des adénocarcinomes pulmonaires, plusieurs mutations telles que EGFR, ALK, ROS1, et BRAF sont à rechercher. Ces investigations sont également pertinentes pour les carcinomes épidermoïdes, particulièrement chez les patients ayant un faible tabagisme. La détection d'une addiction oncogénique permet la proposition de thérapies ciblées, qui peuvent significativement améliorer les résultats cliniques et la qualité de vie des patients. Nous ne détaillerons pas plus ces situations d'addictions oncogéniques, étant le plus souvent exclusives d'un bénéfice à l'immunothérapie [25].

## 2. Évaluation des contre-indications à l'immunothérapie

En l'absence d'addiction oncogénique ciblable, la proposition d'une immunothérapie doit être considérée. Toutefois, cette décision doit reposer sur une évaluation rigoureuse des potentielles contre-indications à l'immunothérapie. Plusieurs facteurs sont ainsi pris en compte [26] dont :

- Comorbidités : Les patients ayant subi une greffe d'organe ou recevant une corticothérapie systémique à haute dose présentent des risques accrus de complications sous immunothérapie. La présence d'une pathologie dysimmunitaire est également une potentielle contre-indication.
- Âge avancé : Les patients âgés peuvent avoir une tolérance réduite à la combinaison chimio-immunothérapie, nécessitant une évaluation attentive de leur état général et de leurs capacités fonctionnelles.
- État général : L'état de performance du patient, souvent évalué par l'indice de performance ECOG, est crucial pour déterminer l'aptitude à recevoir une immunothérapie.

## 3. Options thérapeutiques selon le niveau d'expression du PD-L1

L'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales est un biomarqueur essentiel pour orienter les choix thérapeutiques. Il s'agit d'une molécule le plus souvent membranaire potentiellement exprimée par les cellules tumorales et pouvant avoir comme conséquences un échappement immunitaire. Il a été démontré dans le CBNPC des bénéfices proportionnels au niveau d'expression de ce biomarqueur qui sont détaillés dans une section ultérieure de ce manuscrit. Le niveau d'expression de PD-L1 est évalué par immunohistochimie, et les options de traitement varient en fonction du pourcentage d'expression :

### II.2.1 Expression de PD-L1 $\geq$ 50%

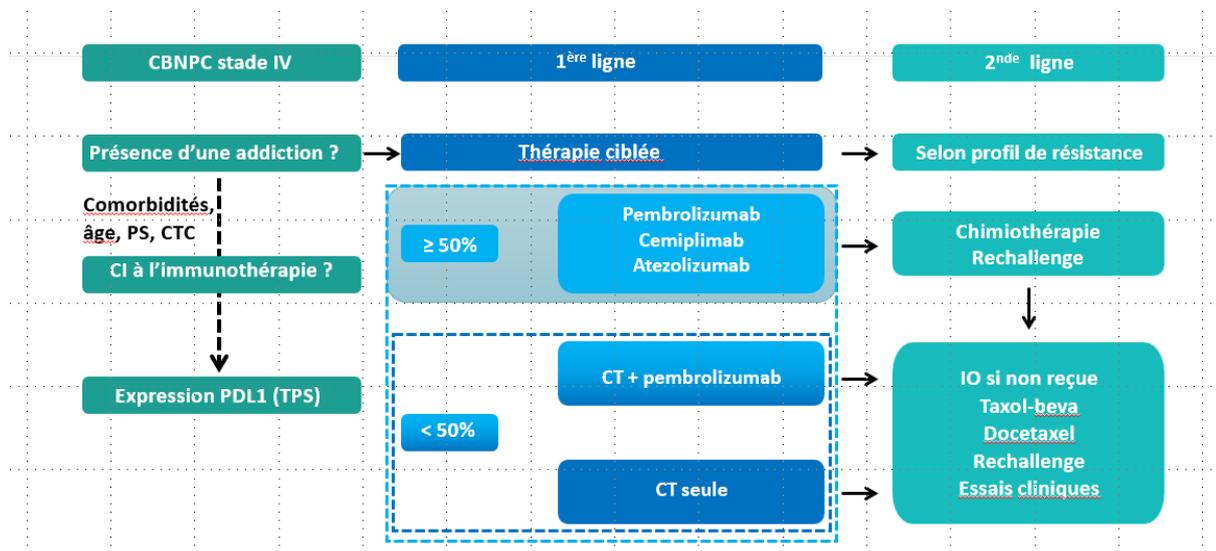
Pour les patients dont les tumeurs expriment PD-L1 à un niveau égal ou supérieur à 50% de cellules tumorales, l'immunothérapie seule est une option. Les options incluent des inhibiteurs

de points de contrôle immunitaire tels que le Pembrolizumab, le Cemiplimab ou l'Atezolizumab. Ces agents ont démontré des bénéfices significatifs en termes de survie globale et de survie sans progression dans cette population de patients.

## II.2.2 Expression de PD-L1 < 50%

Lorsque l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est inférieure à 50%, des combinaisons de chimiothérapie et d'immunothérapie, avec le Pembrolizumab par exemple, peuvent être envisagées pour potentialiser les effets thérapeutiques.

La prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules repose ainsi sur une classification précise des patients basée sur des critères de biologie moléculaire et immunologiques. La recherche d'addictions oncogéniques permet l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques, tandis que l'évaluation des contre-indications à l'immunothérapie et le niveau d'expression de PD-L1 orientent les choix de traitements par chimiothérapie et/ou immunothérapie. Cette approche de plus en plus personnalisée vise à optimiser la prise en charge thérapeutique tout en minimisant les risques de toxicité, dans l'optique de mieux identifier les patients pouvant tirer bénéfice de chaque stratégie disponible (figure 9).



**Figure 9 :** Synthèse des facteurs à prendre en compte pour adapter la prise en charge d'un patient porteur d'une CBNPC de stade IV.

Il convient désormais de détailler les modalités d'action de l'immunothérapie tant d'un point de vue clinique que biologique pour en identifier les avantages mais aussi d'éventuelles limites.

### 4. Efficacité de l'immunothérapie dans le traitement du CBNPC

Après avoir développé les mécanismes connus de résistance d'un point de vue biologique, nous nous proposons ici de détailler l'efficacité actuellement observée en clinique avec l'immunothérapie dans différentes conditions, incluant les stades métastatiques, localement avancés et désormais précoces.

#### 4.1. Stades métastatiques

Comme décrit précédemment, les patients porteurs d'un CBNPC à un stade métastatique peuvent bénéficier d'une immunothérapie seule en cas de PD-L1 fortement exprimé par les cellules tumorales ( $\geq 50\%$ ) voire combiné à une chimiothérapie, quel que soit le PD-L1 et ce en l'absence de contre-indication à l'immunothérapie.

##### 4.1.1. IO seule en 1ère ligne métastatique

L'immunothérapie seule est une option en routine clinique dès lors que la tumeur présente un PD-L1  $\geq 50\%$ , ce qui est observé en population générale dans environ 30% des cas. Cela repose sur des données d'essais randomisés de phase 3 (tableau 1), qui établissent des taux de réponse pour l'immunothérapie autour de 40%, des médianes de survie sans progression et de survie globale respectives autour de 8 et 25 mois avec une réduction du risque de décès de 40%.

Essai	PD-L1	IO (vs CT)	PFS (IO vs CT)	OS (IO vs CT)	HR (OS) [IC95]
Keynote 024 [27,28]	PD-L1 $\geq 50\%$	Pembrolizumab	7.7 vs 5.5	30.0 vs 14.2	0.63 [0.47-0.86]
IMPower 110 [29]	TC3 ou IC3	Atezolizumab	8.2 vs 5	20.2 vs 14.7	0.59 [0.40-0.89]
Empower-Lung 1 [30]	PD-L1 $\geq 50\%$	Cemiplimab	8.1 vs 5.3	26.1 vs 13.3	0.57 [0.46-0.71]

**Tableau 1** : Données d'activités cliniques de l'immunothérapie en 1<sup>ère</sup> ligne, en cas d'expression de PD-L1  $\geq 50\%$ .

##### 4.1.2. CT-IO en 1ere ligne métastatique

Une autre option, indépendamment de l'expression du PD-L1 est la combinaison d'une chimiothérapie (adaptée au sous-type histologique) avec une immunothérapie anti-PD-1. Dans le cadre du CBNPC et à la date de rédaction de ce manuscrit, seule les combinaisons de chimiothérapies associées au Pembrolizumab sont disponibles en France (tableau 2).

Essai	IO + CT	PFS (IO+CT vs CT)	OS (IO+CT vs CT)	HR (OS) [IC95]
Keynote 407 [31]	Pembrolizumab + Platine + (nab)Paclitaxel	8.0 vs 5.1	17.2 vs 11.6	0,71 [0,59-0,85]
Keynote 189 [32]	Pembrolizumab + Platine + Pemetrexed	9 vs 4.9	22.0 vs 10.6	0.60 [0.50-0.72]
IMPower 131 [33]	Atezolizumab + Platine + (nab)Paclitaxel	6.3 vs 5.6	14.2 vs 13.5	0.88 [0.73-1.05]
IMPower 132 [34]	Atezolizumab + Platine+ Pemetrexed	7.6 vs 5.2	18.1 vs 13.6	0.81 [0.64-1.03]
Orient-11 [35]	Sintilimab + Platine + Pemetrexed	9.2 vs 5.0	24.2 vs 16.8	0.65 [0.50-0.85]
Orient -12 [36]	Sintilimab + Platine + Gemcitabine	5.5 vs 4.9	NR	0.57 [0.51-0.91]

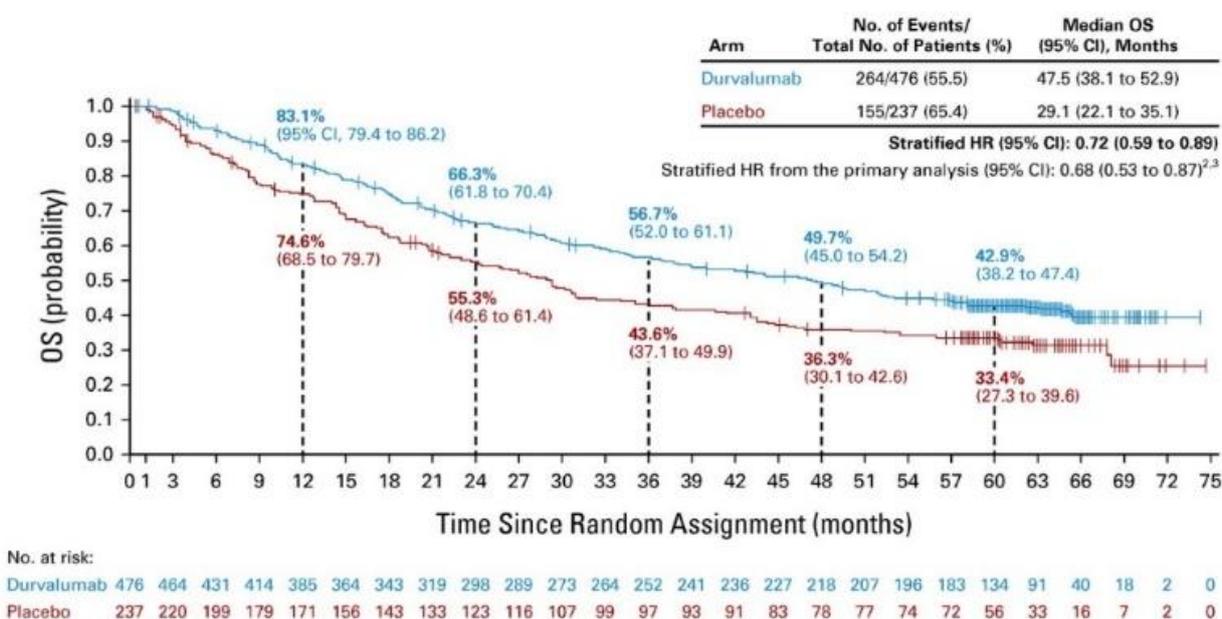
**Tableau 2** : Données d'activités cliniques de l'immunothérapie en 1<sup>ère</sup> ligne, indépendamment de l'expression de PD-L1.

Des données négatives étaient quant à elles observées pour les combinaisons à base d’Atezolizumab.

#### 4.2. Stades localement avancés

Dans des stades localement avancés, toute la discussion lors de la réunion de concertation pluridisciplinaire porte sur la résecabilité tumorale. En cas de non-résecabilité et/ou non-opérabilité, il est alors proposé un traitement multimodal par radio-chimiothérapie, de façon concomitante ou séquentielle. L’immunothérapie est actuellement proposée dans ce cadre, à l’issue de la radio-chimiothérapie en cas de CBNPC non-progressif, sur la base des données de l’essai de phase 3 PACIFIC [37], confirmé par les données de vraie vie de PACIFIC-R [38].

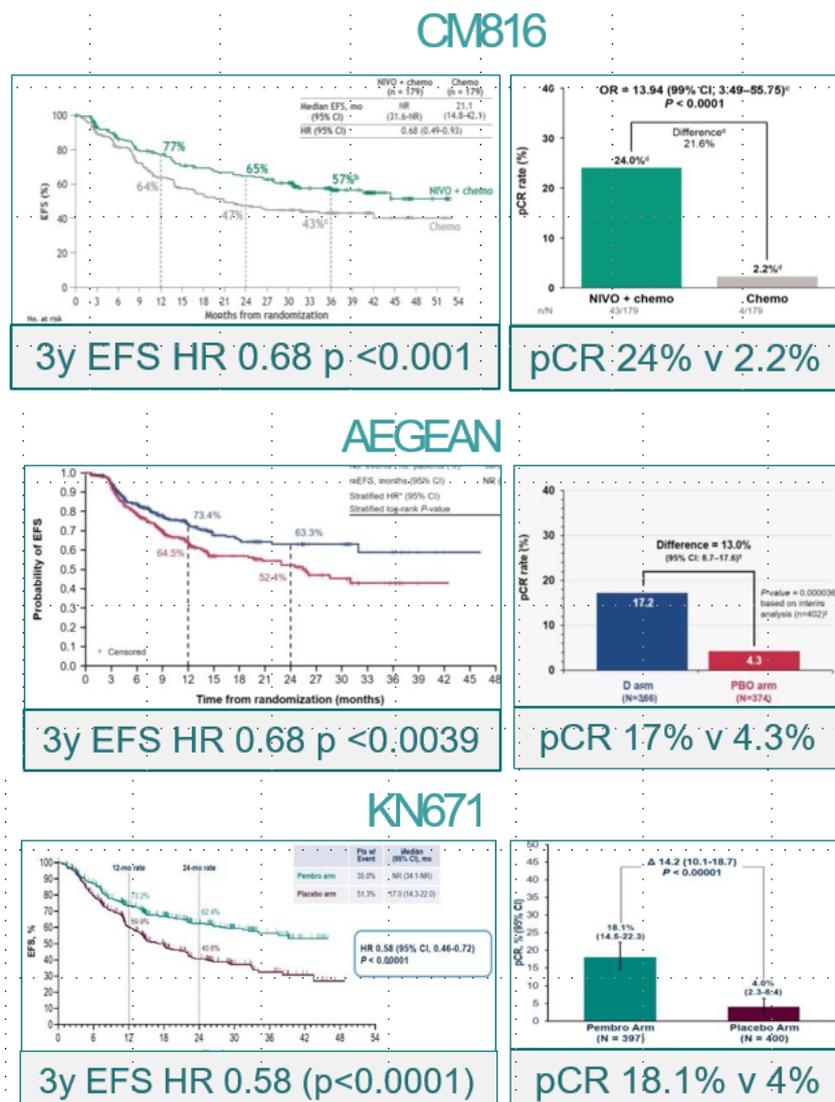
Historiquement, la prise en charge standard pour les patients atteints de CBNPC de stade III inopérable après radio chimiothérapie (CRT) consistait en une simple surveillance, ce qui était associé à une survie globale médiocre. Les tentatives d’amélioration de la survie par l’ajout de chimiothérapie de consolidation, l’utilisation d’autres agents anticancéreux systémiques en consolidation, ou l’augmentation de la dose de radiothérapie n’ont pas montré de bénéfice clinique significatif. Dans l’étude PACIFIC, les patients étaient randomisés (2 :1) pour recevoir du Durvalumab (10 mg/kg IV) ou un placebo, administré toutes les deux semaines en consolidation jusqu’à 12 mois ou progression voire toxicité. Les résultats mis à jour montrent une amélioration importante de la survie globale (HR de 0,72 ; IC à 95 %, 0,59 à 0,89 ; médiane de 47,5 mois vs 29,1 mois) ainsi qu’un bénéfice en termes de survie sans progression durable avec une réduction par un facteur 2 du risque de récurrence (HR de 0,55 ; IC à 95 %, 0,45 à 0,68 ; médiane de 16,9 mois vs 5,6 mois) (figure 10). Les taux de survie globale estimés à 5 ans pour le Durvalumab et le placebo étaient respectivement de 42,9 % (IC à 95 %, 38,2 à 47,4) contre 33,4 % (IC à 95 %, 27,3 à 39,6).



**Figure 10 :** Données de survie globale (OS) actualisées à 5 ans d’après l’étude PACIFIC [37].

### 4.3. Stades précoces

Plus récemment, il a été rapporté de nombreuses données concordantes sur le bénéfice apporté par l'immunothérapie dans les CBNPC, y compris à des stades précoces et opérables. Historiquement, les premières données publiées avec modification d'un changement de pratique reposent sur l'étude randomisée de phase 3 CHECKMATE-816. Cette étude randomisait des patients opérable pour un CBNPC de stade Ib à IIIA pour recevoir en néoadjuvant soit 3 cycles de chimiothérapie seule (groupe contrôle) soit 3 cycles de chimiothérapie associée au Nivolumab (bras expérimental) [39]. Les résultats se sont avérés positifs sur les co-critères de jugement principaux avec une réponse pathologie complète de 24% (contre 2.2% dans le groupe chimiothérapie) et une médiane de survie sans événement de 43,8 mois (HR de 0,66 ; IC à 95 %, 0,49 à 0,90) [40].



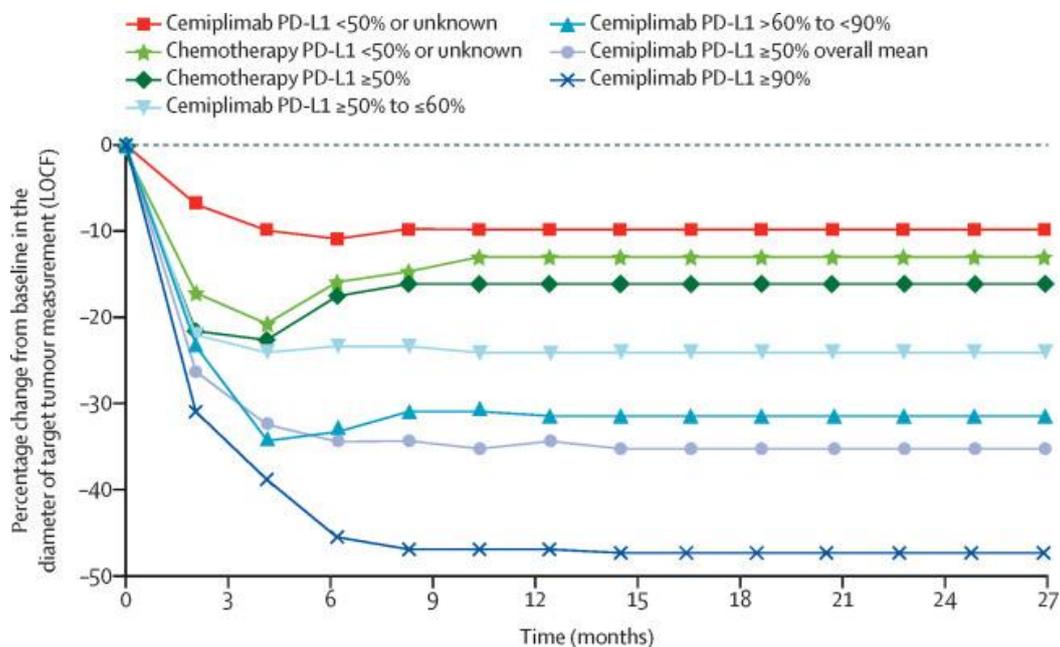
**Figure 11** : Principaux résultats positifs démontrant un bénéfice de la chimio-immunothérapie en péri-opératoire.

Plusieurs essais ont d'ailleurs évalué l'intérêt d'une immunothérapie seule dans le contexte néoadjuvant, sans bénéfice démontré suffisant à ce jour (figure 11). Tout comme pour la

CHECKMATE-816, les essais de phase 3 ont été nombreux à démontrer des bénéfices pour la combinaison chimiothérapie et immunothérapie en néoadjuvant voire en péri-opératoire, combinant alors des cures d'immunothérapie en néoadjuvant et adjuvant [41] et [42].

## 5. PD-L1 comme biomarqueur de réponse à l'immunothérapie

Comme illustré par les indications conditionnées à l'expression du PD-L1 en 1<sup>ère</sup> ligne, le PD-L1 est un marqueur prédictif de bénéfice à l'immunothérapie. Cependant, ce biomarqueur reste actuellement imparfait. En effet, si on rappelle les taux de réponse sous immunothérapie dans cette population de patient sélectionnée par un PD-L1  $\geq 50\%$ , les taux de réponse n'excèdent pas 50%, certes permettant pour 50% des patients de tirer bénéfice d'un traitement sans chimiothérapie mais exposant tout de même l'autre moitié de ces patients à un traitement restant sans réel bénéfice clinique au prix d'une potentielle toxicité. Le taux d'expression du PD-L1 reste toutefois un marqueur pertinent en clinique et sa place est bien établie dans l'algorithme thérapeutique de nos patients. En témoigne la capacité de prédiction de bénéfice du PD-L1 qui s'améliore nettement à mesure que ce marqueur augmente (figure 12). Il est ainsi rapporté des résultats bien meilleurs pour les patients porteurs d'une tumeur exprimant le PD-L1 à des niveaux très élevés, en comparaison à des niveaux relativement inférieurs [41].



**Figure 12 :** Efficacité du Cemiplimab selon le taux d'expression du PD-L1 dans une population de patients sélectionnés sur le PD-L1 (d'après [41])

Ces constats nous amènent donc à la problématique de réussir tout d'abord à mieux identifier les patients qui peuvent tirer bénéfice d'une immunothérapie pour éviter l'exposition à une molécule potentiellement inefficace et vectrice de toxicité. L'identification de tel biomarqueur pourrait également concourir à une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent ces résistances pour soit les anticiper soit les reverser, ceci s'inscrivant dans une démarche de médecine personnalisée.

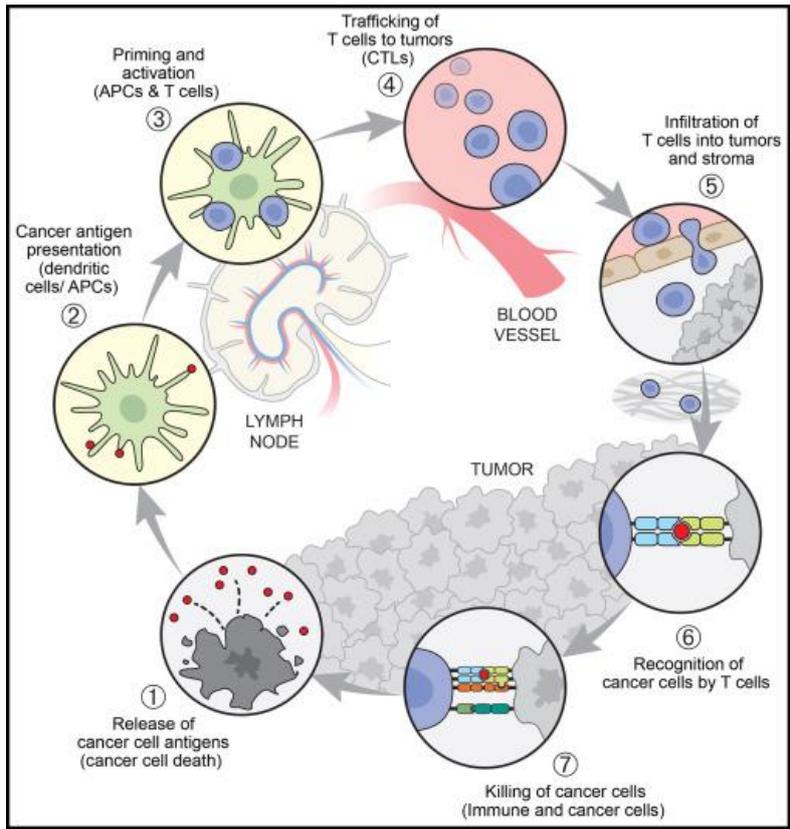
### **III. Principes de l'immunothérapie et mécanismes d'action**

La réponse immunitaire repose sur deux grands principes. Il faut tout d'abord considérer l'ensemble des acteurs impliqués dans la réponse immunitaire de façon transversale avec toutes les interrelations envisageables entre la tumeur et son hôte. Mais il faut aussi considérer les variations de ces acteurs, potentiellement différents cette fois-ci au cours du temps et de l'exposition à une immunothérapie.

#### **1. Les étapes clés de la réponse immunitaire antitumorale**

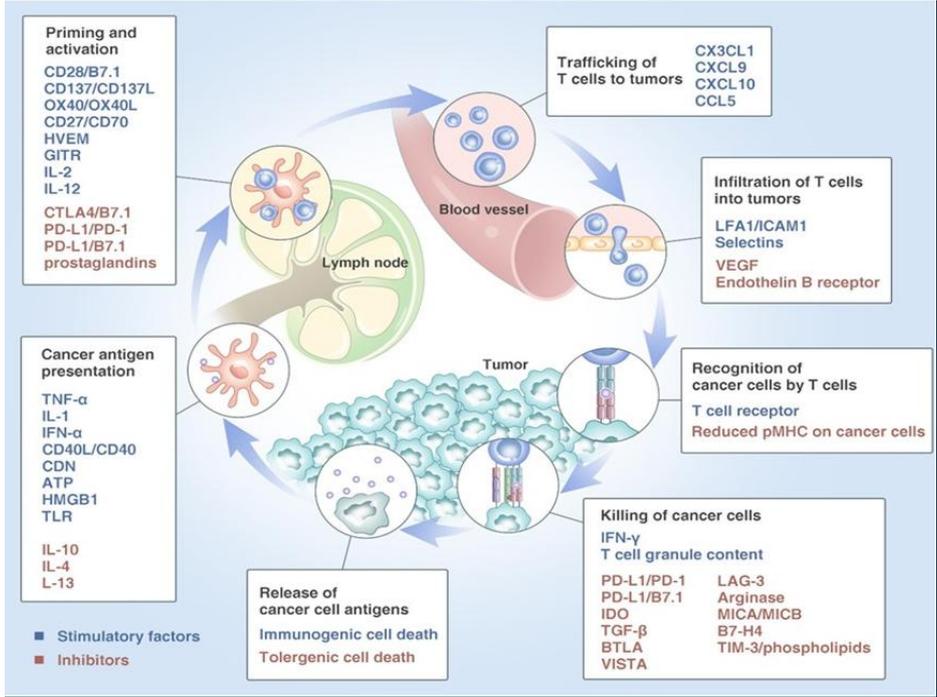
Pour qu'une réponse immunitaire antitumorale aboutisse à la destruction efficace des cellules cancéreuses, un ensemble d'événements successifs doit être initié, événements qui doivent également pouvoir se répéter dans le temps. Ces étapes forment ce que l'on appelle le cycle de l'immunité antitumorale [43]. Dans la première étape, les néo-antigènes créés par l'oncogénèse sont libérés et capturés par les cellules dendritiques (DC) pour être traités. Pour qu'une réponse des cellules T anticancéreuses soit générée, cette étape doit s'accompagner de signaux activant l'immunité, au risque d'induire une tolérance périphérique aux antigènes tumoraux. Ces signaux immunogènes peuvent inclure des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs libérés par les cellules tumorales et/ou le microbiote.

Puis, les DC présentent les antigènes capturés sur les molécules du CMH de classe I et du CMH de classe II aux cellules T, ce qui entraîne l'initiation (« priming ») et l'activation des cellules T effectrices contre les néo-antigènes spécifiques du cancer, ou contre lesquels la tolérance centrale a été incomplète. La nature de la réponse immunitaire est déterminée à ce stade, avec un équilibre critique entre le ratio des cellules T effectrices et des cellules T régulatrices. Enfin, les cellules T effectrices activées doivent se diriger vers la tumeur, infiltrer le lit tumoral, reconnaître et se lier spécifiquement aux cellules cancéreuses via l'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et son antigène correspondant lié au CMH I, pour tuer leur cellule cible. La destruction de la cellule cancéreuse libère de nouveaux antigènes associés à la tumeur, pouvant ainsi augmenter et entretenir la réponse dans les cycles ultérieurs (figure 13).



**Figure 13 :** Le cycle de l'immunité antitumorale (d'après [43])

A chaque étape de ce cycle (figure 14), différents acteurs moléculaires sont impliqués dont les principaux sont représentés ci-dessous.



**Figure 14 :** Le cycle de l'immunité antitumorale et ses principaux facteurs stimulants et inhibiteurs (d'après [44])

Plusieurs stratégies antitumorales basées sur la réaction immunitaire ont été développées et sont désormais disponibles en routine clinique. Cependant, les molécules ciblant l'interaction PD-L1/PD-1 sont nettement prépondérantes à ce jour. C'est ce que nous allons détailler ici.

## 2. Voies de signalisation du PD-L1

Le paradigme actuel du blocage des points de contrôle immunitaires est basé sur le fait que le ligand PD-L1 est exprimé à la surface des cellules cancéreuses ou immunitaires, avec pour principale conséquence l'inhibition des lymphocytes T CD8+ antitumoraux exprimant le PD-1 (Programmed Death 1) [45]. Cependant, les multiples variations de signalisation de PD-L1 au sein des cellules tumorales s'étendent au-delà de la signalisation cellulaire tumoral en considérant également l'expression et les conséquences du PD-L1 par les cellules immunitaires. Ainsi, l'expression du PD-L1 à la surface d'une cellule tumorale peut par exemple altérer la signalisation dans les cellules tumorales adjacentes ou non tumorales. Spécifiquement, de tels signaux incluent l'engagement canonique du PD-L1 membranaire avec les cellules immunitaires exprimant PD-1. Les cellules cancéreuses adjacentes peuvent également exprimer PD-1 [46], mais aussi des récepteurs membranaires du PD-L1 moins connus comme par exemple CD80 (également désigné par B7-1) [47] ou certaines intégrines [48]. L'expression par une cellule du PD-L1 modifie également sa biologie et voies de signalisation [45]. L'activation de la voie de signalisation dite intrinsèque PD-1/PD-L1 dans les cellules tumorales a pour principales conséquences l'inhibition de STAT3, ce qui réduit la sensibilité aux interférons [49], augmente la prolifération tumorale [50] et la suppression de l'apoptose médiée par FAS–FASL [51]. Il est d'ailleurs important de noter que le PD-L1 ne semble pas avoir les mêmes propriétés biologiques selon sa localisation membranaire ou nucléaire : le PD-L1 nucléaire peut augmenter l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I dans diverses lignées cellulaires [52], influençant la reconnaissance immunitaire spécifique des antigènes.

PD-L1 régule également la réponse aux dommages de l'ADN, ce qui pourrait affecter l'immunogénicité tumorale et la résistance aux traitements [53]. Les anticorps anti-PD-L1, conçus pour interrompre la liaison PD-L1/PD-1 à la surface cellulaire, peuvent ainsi modifier la prolifération des cellules cancéreuses et leur sensibilité aux interférons. Ces effets parfois antagonistes soulignent la nécessité de mieux comprendre et cibler les signaux pathologiques de PD-L1 pour améliorer l'efficacité des immunothérapies et surmonter certaines résistances aux traitements actuels.

## 3. Principaux facteurs de résistance primaire à l'immunothérapie

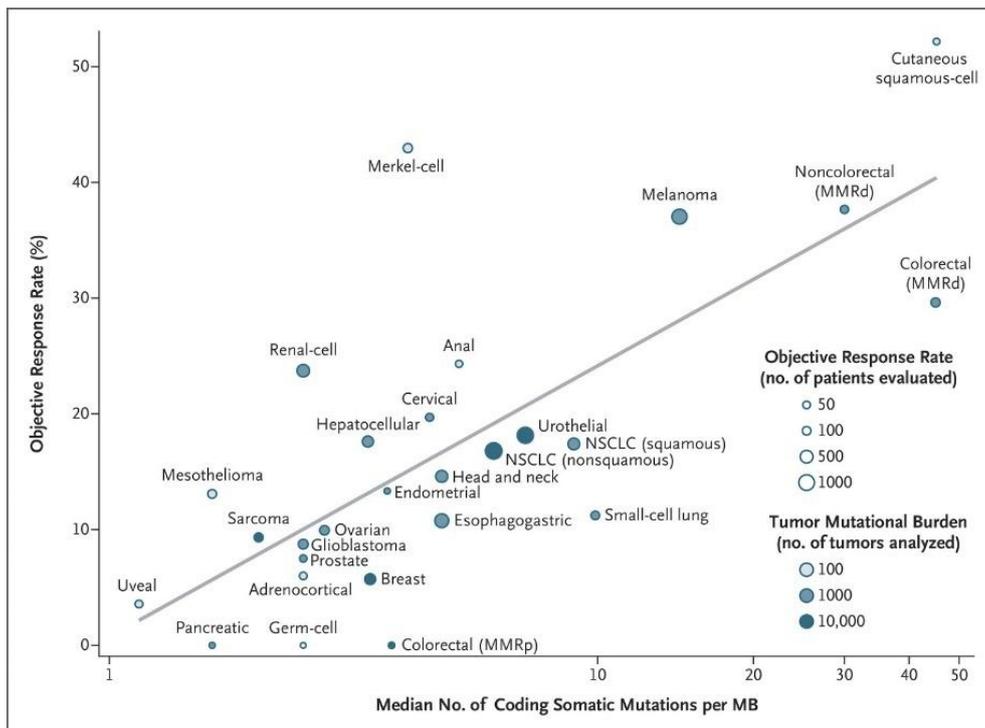
Malgré les résultats sans précédent liés à l'immunothérapie dans le cancer bronchique, un pourcentage élevé de tumeur ne répond pas au traitement ou rechutent après une période de réponse, définissant en clinique une résistance dite primaire ou secondaire. Cela implique des mécanismes de résistance qu'il est nécessaire de comprendre afin de les anticiper et de développer des stratégies pour les surmonter.

Le cycle de l'immunité antitumorale ne fonctionne pas systématiquement de manière optimale et ce à différentes étapes critiques. Les antigènes tumoraux peuvent ne pas être détectés, les DC

et les cellules T peuvent traiter les antigènes comme émanant de l'hôte plutôt que comme des néo-antigènes, créant ainsi des réponses cellulaires T de type régulatrices plutôt que des réponses effectrices. Les cellules T peuvent ne pas se diriger correctement vers les tumeurs, étant empêchées d'infiltrer la tumeur, ou des facteurs dans le microenvironnement tumoral (MET) peuvent supprimer les cellules effectrices produites. Nous nous proposons de détailler ici les principaux facteurs connus, associés à une réponse immunitaire antitumorale. Ces facteurs proposés à ce jour sont multiples tels que la quantité des néo-antigènes tumoraux produits, l'infiltration des cellules T effectrices dans le MET, la modulation épigénétique, la signature transcriptionnelle, l'épuisement des cellules T et le microbiome.

### 3.1. Charge Mutationnelle Tumorale (TMB)

Un biomarqueur proposé pour prédire la réponse aux thérapies anti-PD-1 est la charge mutationnelle tumorale, qui reflète le nombre total de mutations par région codante du génome tumoral. L'efficacité du blocage PD-1/PD-L1 est corrélée avec la charge mutationnelle tumorale : les tumeurs avec des charges mutationnelles élevées sont décrites comme avec une plus grande quantité de néo-antigènes et donc un profil intrinsèque plus immunogène (figure 15) [54]. En comparaison avec d'autres tumeurs solides, les CBNPC sont avec un potentiel immunogènes sur ce critère et sont corrélées à un taux de réponse objective élevé, une survie sans progression prolongée et un bénéfice durable après un traitement par inhibiteurs de PD-1 [55].



**Figure 15** : Taux de réponses aux anti-PD-1 selon la charge mutationnelle tumorale par type histologique de cancer (d'après [55]).

D'un point de vue clinique, ce marqueur reste cependant relativement décevant dans les essais randomisés prospectifs [56,57] sans intégration à ce jour en pratique clinique.

### 3.2. Infiltration des Cellules T Effectrices

La réponse au blocage PD-1/PD-L1 dépend fortement de plusieurs mécanismes altérant l'infiltration des cellules T effectrices dans le microenvironnement tumoral (MET), pouvant aboutir à l'inaccessibilité des cellules T au sein de la tumeur. Ainsi, le nombre et la diversité des cellules T tumorales spécifiques préalablement activées, ainsi que l'infiltration des cellules T (TIL) effectrices dans le MET sont essentiels. Une corrélation a été observée entre la densité des TIL et la survie dans le cancer du poumon. Des niveaux élevés d'infiltration de lymphocytes T CD8+, CD3+ et CD4+ dans le MET ont montré une meilleure survie globale chez les patients atteints de cancer du poumon [58].

Trois immunophénotypes sont ainsi rapportés en fonction de la distribution spatiale des cellules T CD8+ dans le MET [59]. La cartographie de ces immunophénotypes par approche transcriptomique et/ou immunohistochimie (IHC) révèle les voies moléculaires associées à ces phénotypes. Les tumeurs dites inflammées sont principalement associées à la signalisation  $IFN\gamma$ , avec des caractéristiques propres, telles qu'une forte expression de PD-L1 tumoral, la présence de TILs, de cellules B et une présentation antigénique conservée. Les tumeurs excluant les cellules immunitaires de leur MET sont quant à elle définies par l'activation de la signalisation  $TGF\beta$ , la présence de cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC). Enfin, les tumeurs désertiques sur le plan immunitaire sont dépourvues d'infiltration de cellules T et présentent principalement des caractéristiques neuroendocrines ou des cellules tumorales hautement prolifératives avec un métabolisme accru des acides gras. La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est également associée à ces tumeurs. Les tumeurs excluant les cellules immunitaires et désertique sont toutes deux associées à une faible expression du CMH de classe I, probablement en raison de la réduction de l'influence de la signalisation  $IFN\gamma$  dans le milieu tumoral (figure 16). Les signaux néo antigéniques, fournis par la charge mutationnelle tumorale ou les rétrovirus endogènes, ont une prévalence variée au sein de ces trois phénotypes.

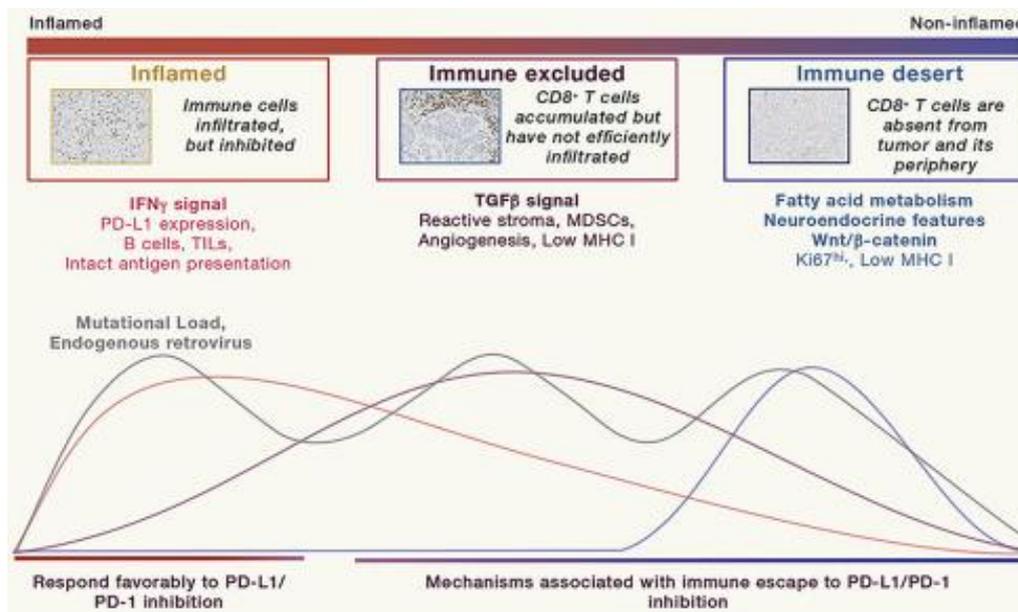


Figure 16 : Illustration du continuum tumoral immunitaire (d'après [59]).

### 3.3. Altérations des voies de signalisation cellulaire

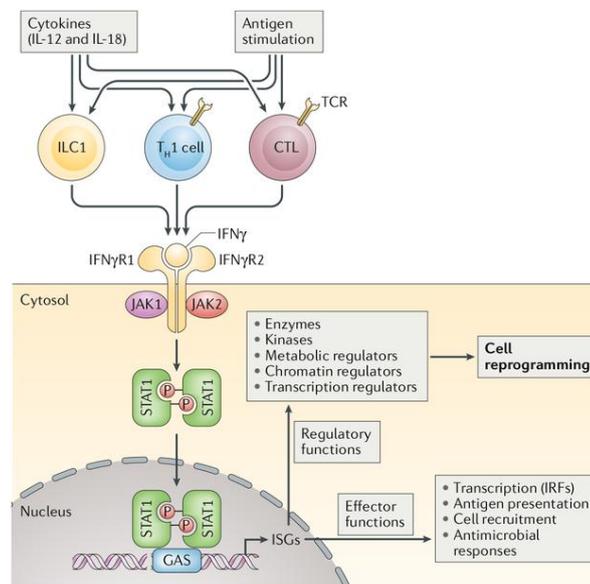
Des perturbations des voies de signalisation cellulaire sont également associées à une diminution de sensibilité aux immunothérapies. Sont par exemple décrites les altérations des voies de signalisation PTEN, MAPK, PI3K, WNT/ $\beta$ -caténine, STING et IFN- $\gamma$ , ainsi qu'une expression constitutive de PD-L1 par les cellules cancéreuses.

#### 3.3.1. Altération de la voie de PTEN

Les mutations du gène PTEN activent le réseau de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), ce qui entraîne de nombreux changements phénotypiques tumoraux caractéristiques. Cependant, les effets principaux de ce gène sur l'oncogenèse via le contrôle de la voie PI3K–AKT–mTOR ne sont peut-être pas la seule manière par laquelle PTEN influence la progression tumorale [60]. Il a ainsi été démontré une régulation par PTEN du réseau d'interférons antiviraux, modifiant ainsi la manière dont les cellules cancéreuses communiquent avec les cellules immunitaires et sont potentiellement ciblées par ces dernières [61]. Un MET actif, infiltré par des cellules T, est crucial pour le succès de l'immunothérapie, et ceci est également influencé par les mutations dans les voies de réparation des dommages de l'ADN. Étant donné que PTEN joue un rôle dans le maintien de l'intégrité génomique, il est probable que la perte de PTEN affecte la réponse immunitaire à deux niveaux différents et pourrait donc être impliqué dans les échecs de réponses à l'immunothérapie.

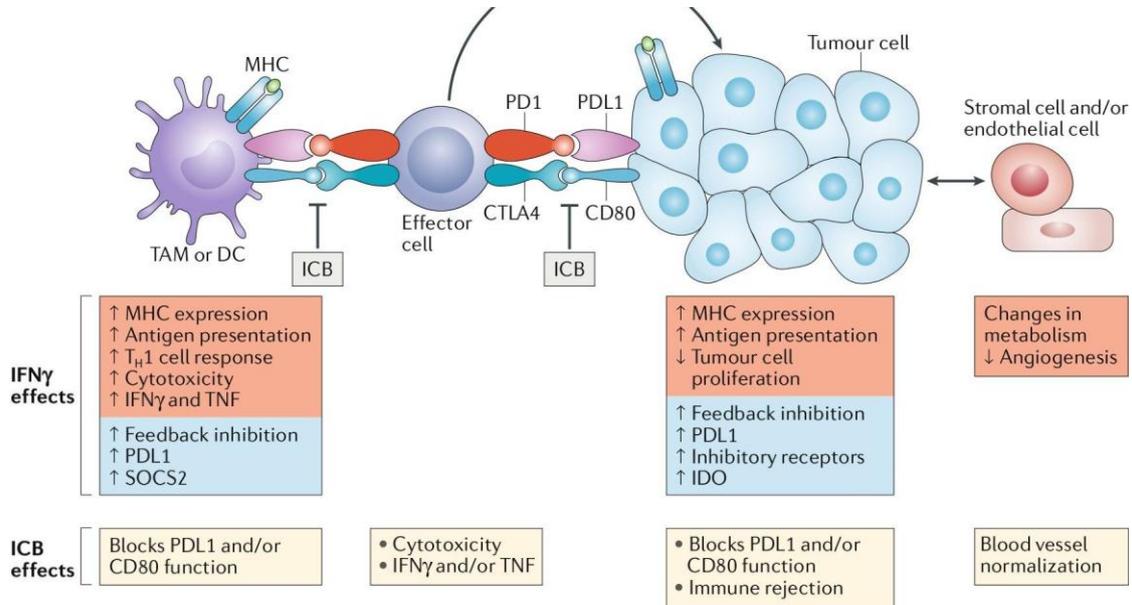
#### 3.3.2. Altération de la voie de l'IFN $\gamma$

L'IFN $\gamma$  est une cytokine qui joue des rôles essentiels dans l'homéostasie tissulaire, les réponses immunitaires et inflammatoires, mais aussi dans la surveillance immunitaire antitumorale [62]. La signalisation par le récepteur de l'IFN $\gamma$  active la voie Janus kinase (JAK) - signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), induisant des fonctions effectrices immunitaires clés (figure 17) [63].



**Figure 17 :** Voie de signalisation de l'IFN $\gamma$  (d'après [62]).

Les fonctions majeures de l'IFN $\gamma$  (encadrés rouges ci-dessous) incluent des effets directs sur les cellules tumorales pour supprimer la prolifération et augmenter la présentation des antigènes (figure 18). Cependant, l'IFN $\gamma$  a également des effets inhibiteurs par rétrocontrôle (encadrés bleus) pouvant atténuer l'immunité antitumorale.



**Figure 18 :** Principaux effets liés à l'IFN $\gamma$  et aux inhibiteurs de checkpoint immunitaire dans les cellules tumorales et cellules dendritiques (d'après [62]).

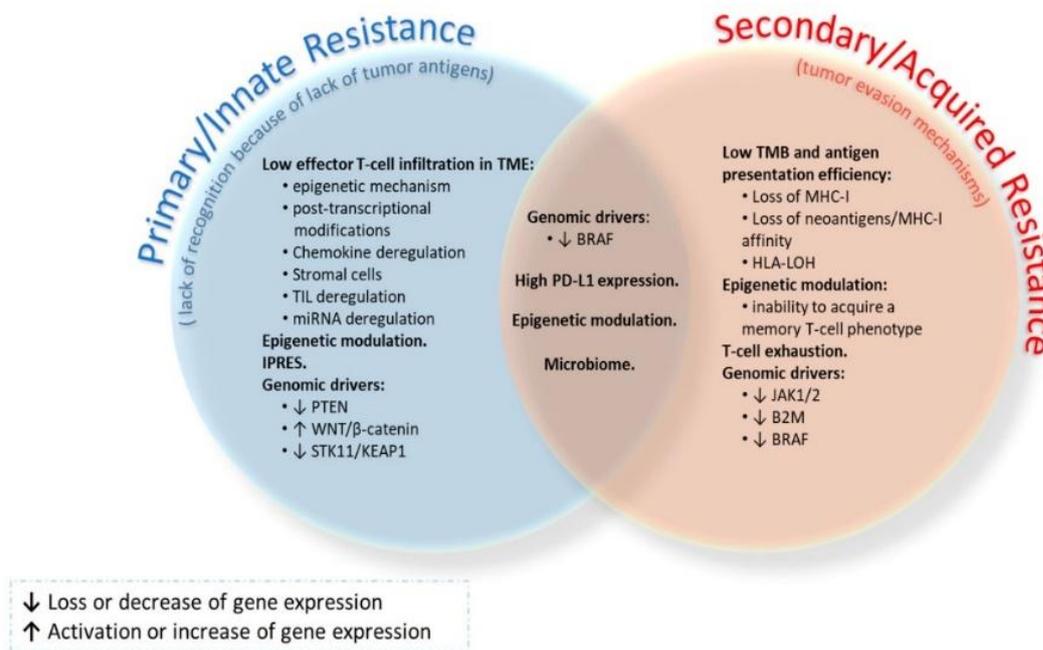
L'IFN $\gamma$  joue ainsi un rôle crucial dans l'efficacité du blocage des points de contrôle immunitaires [62]. Les molécules anti-PD-1/PD-L1 bloquent l'interaction entre ligands PD-L1, CD80 et CD86 exprimés sur les cellules tumorales, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les cellules dendritiques (DC) et leurs récepteurs inhibiteurs correspondants, PD-1 et l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) exprimés sur les cellules T effectrices infiltrant la tumeur (y compris les lymphocytes T cytotoxiques). Cela induit ainsi l'augmentation de la fonction des cellules T (en raison de la diminution de la signalisation inhibitrice qui réverse leur état d'épuisement) et l'augmentation de la production intra tumorale d'IFN $\gamma$ , probablement au moins en partie par les cellules T.

### 3.4. Modulation épigénétique

Les mécanismes épigénétiques comprennent des modifications réversibles dans le génome sans modification des séquences d'acides nucléiques. Les mécanismes épigénétiques incluent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le remodelage des nucléosomes et les altérations de l'expression des ARN non codants. Ces altérations épigénétiques produisent une expression anormale des gènes associés aux tumeurs. Certaines de ces altérations épigénétiques ont été associées à l'efficacité de l'immunothérapie in vivo et in vitro [64]. Par exemple, un rôle jusqu'alors méconnu des enzymes épigénétiques émerge dans l'établissement et le maintien des populations de cellules T de type souches, qui sont des médiateurs essentiels de la réponse aux ICI [65].

#### 4. Facteurs connus de résistance secondaires à l'immunothérapie

L'ensemble des mécanismes de résistance à l'immunothérapie précédemment décrits sont principalement impliqués dans la résistance primaire. La littérature, bien que non consensuelle sur sa définition, individualise également la résistance secondaire (figure 19) [66,67]. Nous détaillons les principaux mécanismes de résistance qui semblent impliqués dans ce cadre.



**Figure 19** : Principaux mécanismes impliqués différemment ou conjointement dans les résistances dites primaires ou secondaires à l'immunothérapie (d'après [66])

##### 4.1. Modification d'expression de PD-L1

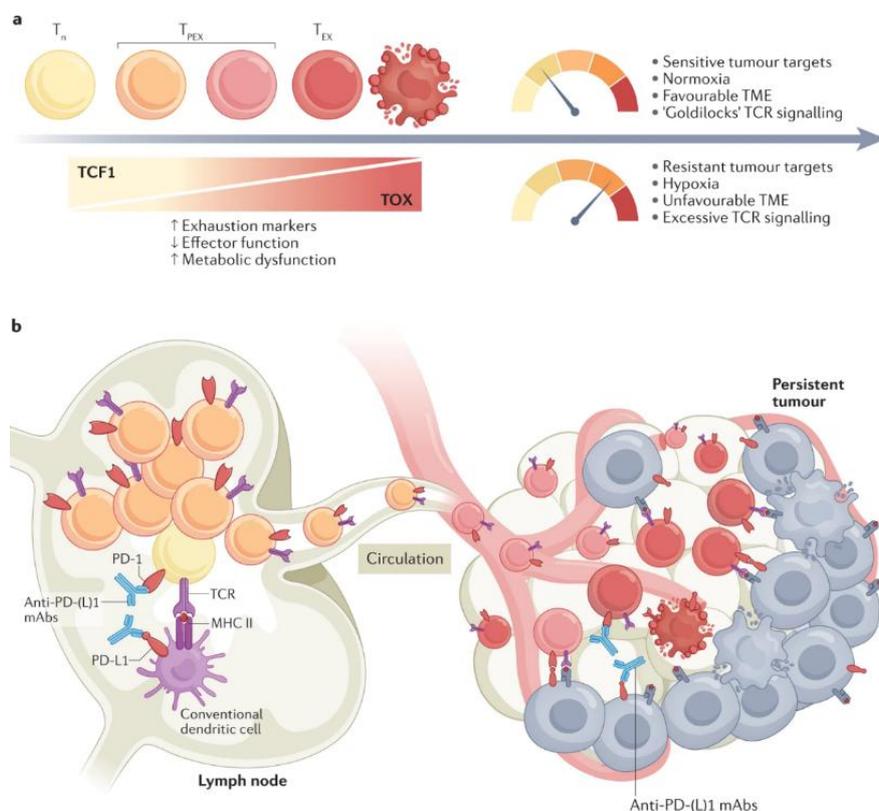
La surexpression de PD-L1 existe souvent dans le MET, ainsi que dans les cellules immunitaires, stromales et tumorales, et est souvent induite par les cytokines inflammatoires. Dans la résistance immunitaire acquise, une altération de la signalisation de l'IFN- $\gamma$  peut induire une expression très élevée de PD-L1 au moment de la résistance, ce qui souligne l'importance d'autres facteurs dans l'absence de réponse aux ICI [68]. La résistance aux ICI pourrait s'expliquer en partie par un mécanisme d'échappement intrinsèque des cellules, où PD-L1 inhiberait la signalisation médiée par IFN, protégeant ainsi les cellules tumorales de l'effet cytotoxique de l'IFN [49].

##### 4.2. Épuisement des Cellules T

Les cellules T jouent un rôle clé dans la fonction antitumorale. Elles peuvent cependant ne pas être complètement efficaces car une partie d'entre elles entre dans un état dysfonctionnel appelé épuisement lymphocytaire [69]. Dans des conditions physiologiques, les cellules T

reconnaissent et réagissent spécifiquement aux antigènes tumoraux à travers leurs récepteurs T (TCR). Lors du priming des cellules T intra-tumorales, l'équilibre entre la costimulation et la co-inhibition détermine le degré d'activation des cellules T et la réponse immunitaire qui s'en suit. Les cellules T CD8<sup>+</sup> naïves (T<sub>n</sub>) peuvent se différencier le long d'un spectre d'états d'épuisement, associés à une capacité fonctionnelle et proliférative déclinante, allant des cellules T précurseurs épuisées ressemblant à des cellules T souches (TPEX) [70] aux cellules T définitivement épuisées (TEX) qui peuvent également subir une mort cellulaire causée par une surstimulation. En présence continue d'antigènes tumoraux, l'expression du facteur de transcription TCF1 diminue tandis que celle des facteurs de transcription de la famille TOX augmente dans les cellules T. Par conséquent, l'expression des marqueurs d'épuisement (comme PD-1, TIM3, LAG3 et CD39) augmente, la fonction effectrice diminue, et la cellule T subit une dysfonction métabolique. Cependant, la vitesse à laquelle une cellule T individuelle devient épuisée dépend du contexte ; les divers facteurs intrinsèques et extrinsèques des cellules T qui modulent ce processus incluent la charge antigénique (tumorale dans notre contexte), la concentration d'oxygène dans les tissus, la composition immunitaire et la sensibilité des cellules cibles à la cytotoxicité médiée par les cellules T.

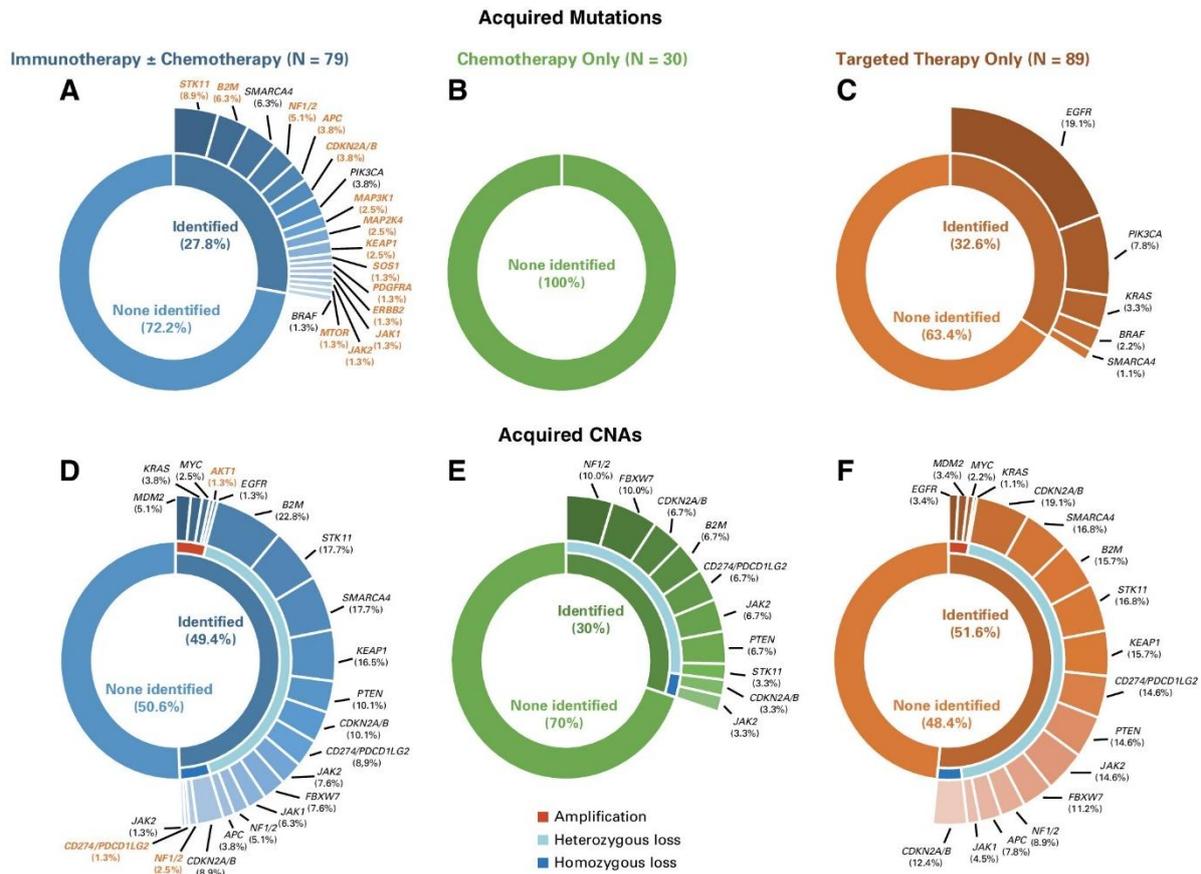
L'état d'épuisement des cellules T est donc caractérisé par une hypo fonctionnalité, elle-même associée à une efficacité réduite des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ou des thérapies cellulaires adoptives (figure 20). Les caractéristiques moléculaires de cet épuisement des cellules T sont liées à des clonotypes de TCR réactifs aux tumeurs, capable de prédire les bénéfices de l'immunothérapie. L'efficacité de l'immunothérapie dépend ainsi en partie de la capacité d'expansion périphérique lymphocytaire et de l'infiltration tumorale des cellules CD8<sup>+</sup> précurseurs épuisées [71]. Le programme d'épuisement des cellules T est initialement un processus bénéfique, ayant pour rôle de protéger les cellules CD8<sup>+</sup> de la mort cellulaire associée à une surstimulation. Ainsi, l'interruption de ce programme pourrait *in fine* nuire à la persistance des cellules réactives antitumorales avec de potentiels résultats paradoxaux [72]. Pour atténuer l'épuisement des cellules T sans interrompre ce programme, il est possible d'optimiser les récepteurs et les voies de signalisation en aval, d'affiner les états transcriptionnels et épigénétiques, et de surmonter la dysfonction métabolique, améliorant ainsi l'efficacité des thérapies cellulaires modifiées [69].



**Figure 20 :** Instauration de cellules T épuisées dans les tumeurs solides persistantes (d'après [69])

#### 4.3. Modification du profil génomique

Il a été publié par Ricciuti et al. une évaluation basée sur des techniques de multiplexage et séquençage, comparant des biopsies tumorales appariées avant et après traitement par immunothérapie [73]. Ces biopsies provenaient de patients atteints de CBNPC et ayant développé une résistance acquise aux ICI. Des profils génomiques complets et une caractérisation immunophénotypique ont ainsi été effectués sur des échantillons de 82 patients atteints de CBNPC, et les résultats ont été comparés à une cohorte témoin de patients traités par chimiothérapie (n = 32) ou TKI (n = 89). Des mutations de résistance ont été identifiées dans 27,8 % des cas traités par immunothérapie, incluant des mutations acquises avec perte de fonction dans *STK11*, *B2M* (beta-2- microglobuline), *APC*, *MTOR*, *KEAP1* et *JAK1/2* (figure 21). Ces altérations acquises semblent d'ailleurs spécifiques car non observées dans les groupes témoins. L'immunophénotypage des échantillons appariés avant et après ICI a montré des diminutions significatives des TIL, des cellules T CD3e+ et CD8a+, et de l'engagement PD-L1–PD-1, ainsi qu'une augmentation de la distance entre les cellules tumorales et les cellules T CD8+PD-1+. Il existait également eu une diminution significative de l'expression du HLA de classe I dans la cohorte traitée par immunothérapie au moment de l'acquisition de résistance par rapport aux cohortes de chimiothérapie (P = .005) et de thérapie ciblée (P = .01). Ces résultats soulignent l'hétérogénéité génomique et immunophénotypique de la résistance aux immunothérapies dans le CBNPC.



**Figure 21 :** Graphiques illustrant le taux de mutations acquises au moment de la résistance à (A) l’immunothérapie (anti-PD-(L)1) +/- chimiothérapie, (B) la chimiothérapie seule, et (C) thérapie ciblée (chez des patients avec addiction oncogénique) chez des patients atteints de CBNPC. D’autres graphiques illustrent le taux d’altérations du nombre de copies (CNA) acquises lors de la résistance à (D) l’immunothérapie (anti-PD-(L)1) +/- chimiothérapie, (E) la chimiothérapie seule, et (F) thérapie ciblée (chez des patients avec addiction oncogénique). Les étiquettes des altérations génomiques identifiées uniquement dans la cohorte de thérapies basées sur PD-(L)1 sont en orange ; (d’après [73])

En conclusion, les mécanismes de résistances actuellement identifiés à l’immunothérapie semblent différents lorsqu’une résistance est observée d’emblée ou acquise [66]. Les mécanismes de résistances apparaissent également comme pouvant être intrinsèques aux cellules tumorales avec des connaissances émergentes sur des composantes extrinsèques reposant sur le MET [74]. Ces mêmes mécanismes peuvent être combinés de façon synergique mais aussi se succéder voire se cumuler au cours du temps (figure 22), ce qui devra être pris en compte lors du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à surmonter cette résistance [75].



**Figure 22 :** Potentiel synergisme des mécanismes de résistance à l’immunothérapie (d’après [73]).

Différents mécanismes de résistance peuvent converger et se potentialiser. Ainsi, les tumeurs « immuno-désertiques » montrent une tolérance ou un manque de priming des cellules T. Les tumeurs « immuno-exclues » peuvent échapper aux facteurs stromaux en raison de barrières mécaniques, de facteurs vasculaires ou d’un profil cytokinique immunosuppresseur. Nous n’avons jusqu’à présent pris en compte que les facteurs liés à la tumeur et au MET mais des paramètres dépendant de l’hôte influencent également la résistance au traitement incluent les facteurs endocriniens, métaboliques, environnementaux (dysbiose, consommation d’antibiotiques ou de stéroïdes) et personnels (âge, maladie chronique ou susceptibilité génétique).

Des recherches supplémentaires, disséquant l’hétérogénéité intra tumorale et de l’hôte, sont nécessaires pour apporter des réponses concernant la réponse à l’immunothérapie et développer des traitements plus efficaces pour le cancer du poumon. Ces explications illustrent la complexité et la diversité des mécanismes de résistance à l’immunothérapie dans le cancer du poumon, ce qui souligne la nécessité de stratégies thérapeutiques adaptées et combinées pour surmonter ces résistances et améliorer l’efficacité des traitements.

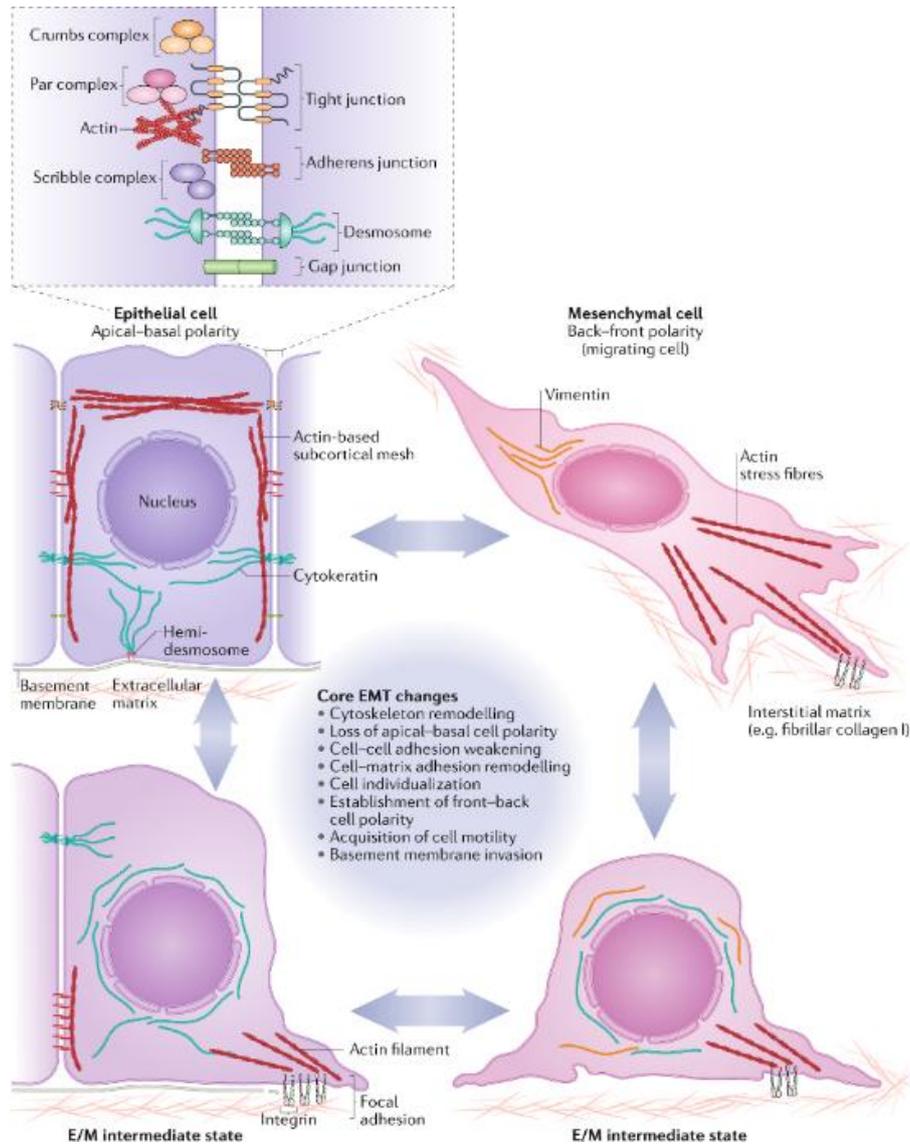
#### **IV. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et cancer bronchique**

##### **1. Définition de la TEM**

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus biologique au cours duquel les cellules d’origine épithéliales acquièrent des phénotypes et des comportements mésenchymateux suite à la répression des caractéristiques épithéliales [76]. La TEM est déclenchée en réponse à des signaux que les cellules reçoivent de leur microenvironnement. L’état épithélial des cellules où débute la TEM se caractérise par des jonctions cellulaires

intercellulaires stables, une polarité apico-basale et des interactions avec la membrane basale. Au cours de la TEM, des modifications transcriptionnelles et des mécanismes de régulation post-traductionnelle conduisent à la répression de ces caractéristiques épithéliales et à l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses. Les cellules adoptent alors une morphologie fusiforme, ainsi qu'une capacité de migration accrue, associée des propriétés invasives décuplées.

Un paradigme central dans le développement de ce domaine de recherche est que la TEM est active à la fois dans les tissus normaux lors du développement et de la cicatrisation, mais également comme mécanisme essentiel dans la pathogenèse du cancer et de la fibrose. Le point de départ commun des divers types de TEM est la répression de certaines caractéristiques du phénotype épithélial. Cependant, il est désormais reconnu que les programmes de TEM ne fonctionnent pas comme des interrupteurs binaires qui font passer les cellules d'un état entièrement épithélial à un état entièrement mésenchymateux. Il demeure incertain si des états phénotypiques discrets sont disposés le long du spectre phénotypique épithélio-mésenchymateux ou s'il existe plutôt un continuum de ces états sans limites distinctes et définies. Il n'est pas non plus évident que ces états intermédiaires représentent des états stables dans des contextes biologiques spécifiques. Un continuum d'états intermédiaires de TEM pourrait permettre une polarisation rapide entre les cellules possédant différentes combinaisons de ces caractéristiques, caractérisant ce processus d'une grande plasticité phénotypique. De plus, il est possible que les états phénotypiques entre les extrémités entièrement épithéliales et entièrement mésenchymateuses ne soient pas disposés le long d'un spectre linéaire, et que plusieurs voies alternatives puissent permettre à une cellule épithéliale de progresser vers un état mésenchymateux. Enfin, il est rapporté que les cellules activant les programmes de TEM dans les tissus matures sous des conditions pathologiques expriment majoritairement des combinaisons de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, et ne complètent que rarement l'ensemble du programme de TEM, suggérant que les TEM partielles pourraient représenter la norme plutôt que l'exception (figure 23).



**Figure 23 :** Illustration des différents états partiels et extrêmes de transition épithélio-mésenchymateuse (d'après [76]).

La TEM a été initialement décrite par Greenburg et Hay, qui ont démontré que le microenvironnement pouvait avoir des effets sur la morphologie et les capacités de migration des cellules épithéliales en culture [77]. Les premières preuves de TEM *in vivo* proviennent de l'embryogénèse et de la biologie du développement [78]. Lors de la gastrulation, la TEM favorise la génération de cellules mésenchymateuses du mésoderme naissant à partir de l'épiblaste. De plus, la TEM est activée dans les cellules de la crête neurale et augmente leur capacité migratoire, leur permettant de se disperser vers plusieurs sites à travers l'embryon en développement.

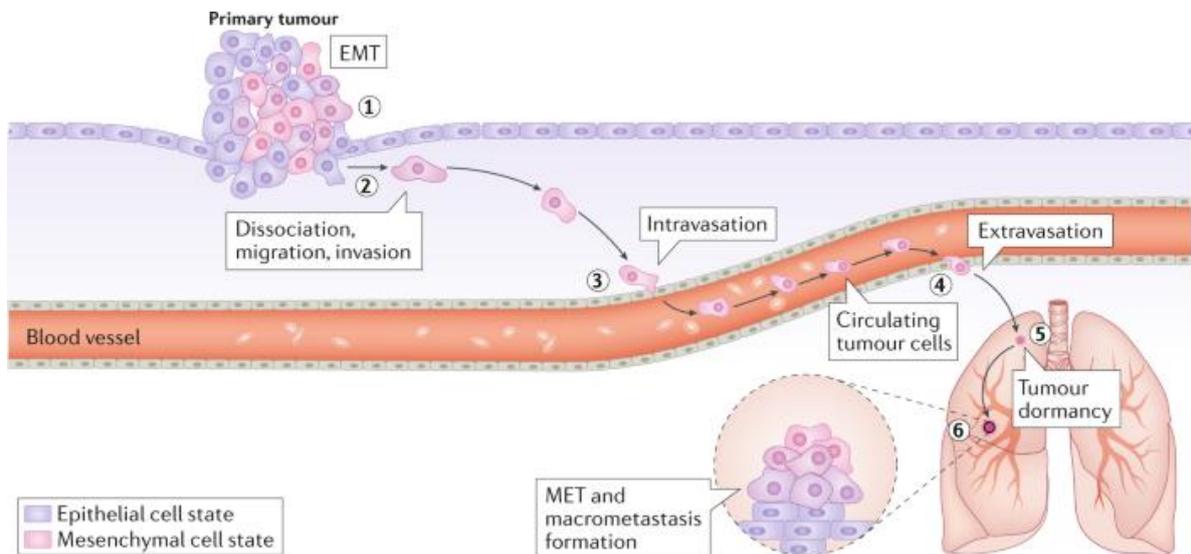
Chez l'adulte, les programmes de TEM sont également importants pour la régénération tissulaire et la réparation observée lors de la cicatrisation des plaies [79]. Au cours de ces processus, les cellules épithéliales normalement non-motiles subissent une TEM pour migrer à travers le site de la plaie, proliférer, puis revenir à l'état épithélial pour restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale.

Le troisième contexte impliquant une TEM est celui du processus tumoral développé ci-dessous.

## 2. TEM dans le processus métastatique

Dans le contexte de la pathogenèse du cancer, il est devenu évident que les cellules néoplasiques dans les carcinomes à un stade précoce sont dans un état semblable à l'épithélium et, à mesure que la progression tumorale progresse, acquièrent progressivement des caractéristiques plus mésenchymateuses. Les données actuelles sont désormais nombreuses et suffisantes pour supporter la TEM comme mécanismes rencontrés dans la quasi-totalité des cancers solides et impliqués de la progression tumorale [80].

Les conséquences de la TEM sont nombreuses mais ce processus est régulièrement associé à un état proche d'un phénotype qualifié de cellule souche cancéreuse [81] et d'une résistance à diverses thérapeutiques [82]. La progression métastatique est également associée à un processus de TEM [83]. La progression métastatique est généralement décrite comme comprenant la séquence suivante (figure 24). La première étape, dite d'invasion, nécessite que les cellules tumorales épithéliales desserrent leurs jonctions intercellulaires pour devenir mobiles (étape 1) et qu'elles dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire. La rupture de ces barrières physiques permet aux cellules de migrer et d'envahir les tissus adjacents (étape 2). L'étape suivante est appelée « intravasation », au cours de laquelle les cellules tumorales traversent la lame endothéliale, pénètrent dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et entrent ainsi dans la circulation systémique (étape 3). Seul un petit nombre des cellules néoplasiques libérées semble capable de survivre aux forces de cisaillement rencontrées dans la circulation et à l'anoïkis (mort cellulaire programmée qui se produit lorsque les cellules se détachent de la matrice extracellulaire environnante) provoquée par la perte d'ancrage à la matrice extracellulaire solide. Finalement, certaines cellules survivantes peuvent s'arrêter et extravaser à travers l'endothélium capillaire des organes distants (extravasation) (étape 4). Dans le nouvel environnement stromal qu'ils rencontrent, une sous-population encore plus réduite réussit à s'établir (étape 5) et à proliférer (métastases) en tumeurs secondaires (étape 6). L'activation de la TEM confère ainsi aux cellules tumorales la capacité de migrer, d'envahir, d'intravaser et d'extravaser. Une fois arrivées dans les organes distants, ces cellules mésenchymateuses reviennent à un programme épithélial plus prononcée via la transition mésenchymo-épithéliale afin de retrouver leur capacité de prolifération.



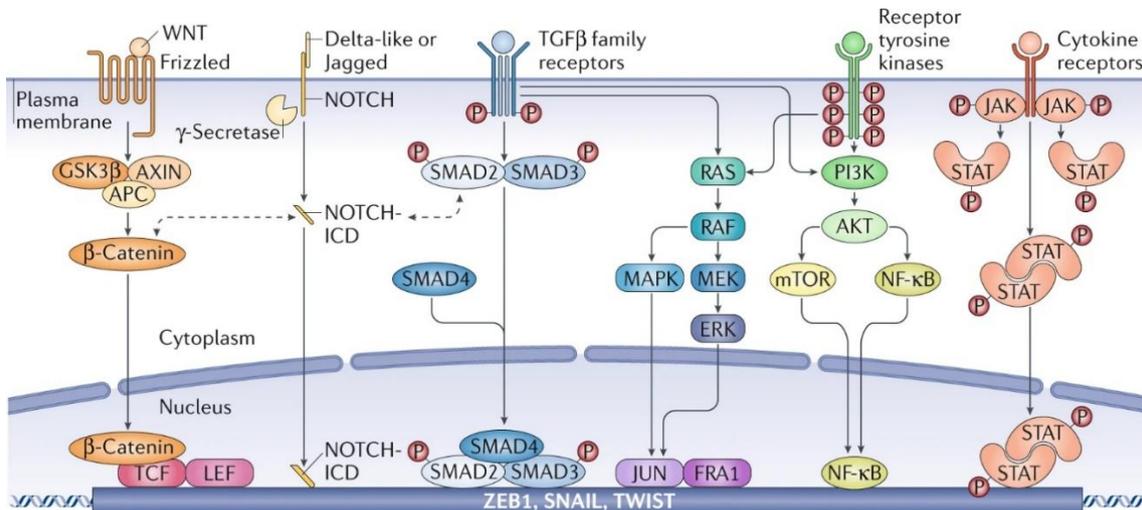
**Figure 24** : Implication de la TEM dans les différentes étapes de la progression métastatique (d'après [76]).

### 3. Acteurs de la TEM

La TEM est un processus cellulaire dont le programme biologique est complexe mais dont les acteurs principaux ainsi que leurs voies de signalisations sont désormais bien identifiés.

### 4. Les principales voies de signalisations impliquées dans la TEM

La TEM peut être induite par plusieurs voies de signalisation intracellulaires qui sont activées lorsque les cellules épithéliales rencontrent des signaux spécifiques émis par les cellules de leur microenvironnement stromal (figure 25). La liaison des ligands à leurs récepteurs spécifiques exprimés par les cellules épithéliales, qu'elles soient normales ou néoplasiques, déclenche des cascades de signalisation intracellulaire qui convergent finalement vers l'activation du programme de TEM. Ces mêmes voies sont capables d'interagir pour activer de manière collaborative le programme de TEM. Ces cascades et leurs signaux activateurs peuvent être impliquées différemment selon le contexte de réparation tissulaire, de cancérogénèse ou de fibrose.



**Figure 25 :** Principales voies de signalisation participant au programme de TEM (d'après [80]).

Ainsi, plusieurs voies de signalisation intracellulaires coopèrent pour induire l'expression des facteurs de transcription inducteurs de la TEM qui sont ZEB (1 et 2), SNAIL (1 et 2) et TWIST. Ces facteurs de transcription agissent ensuite de manière pléiotropique pour favoriser la transition vers un phénotype mésenchymateux. Dans le contexte des cellules non néoplasiques, les voies de signalisation du facteur de croissance TGF $\beta$ , de WNT et de NOTCH sont activées préférentiellement lors du développement embryonnaire et de la cicatrisation des plaies. La TEM induite par TGF $\beta$  et WNT favorise la cicatrisation des plaies mais aussi la fibrose.

La voie canonique WNT est activée par la liaison des ligands WNT canoniques aux récepteurs membranaires de la famille Frizzled. Cela entraîne la libération de la caténine- $\beta$  du complexe GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) -AXIN-APC (protéine de polyose adénomateuse colique). La caténine- $\beta$  se transloque ensuite dans le noyau, où elle se lie aux facteurs de transcription TCF (T cell factor) et LEF (lymphoid enhancer-binding factor) pour activer les gènes qui induisent le programme de TEM.

La voie NOTCH est quant à elle activée par la liaison des ligands de la famille Delta-like ou Jagged au récepteur NOTCH. Cette liaison déclenche une série d'événements de clivage protéolytique qui aboutissent à la libération du domaine intracellulaire actif du récepteur NOTCH (NOTCH-ICD), qui entre dans le noyau pour fonctionner comme un coactivateur transcriptionnel.

La liaison des protéines TGF $\beta$  aux récepteurs de la famille TGF $\beta$  entraîne la phosphorylation des récepteurs et l'activation des complexes SMAD, qui activent le programme de TEM. Les protéines SMAD interagissent également avec  $\beta$ -caténine et NOTCH-ICD expliquant les fortes interactions entre les voies médiées par TGF $\beta$ , WNT et NOTCH. La voie TGF $\beta$  collabore également avec la voie PI3K-AKT, qui à son tour déclenche l'activation du complexe mTOR et du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, la voie p38 MAPK et l'axe de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK. Ces voies sont également activées par la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs respectifs. De plus, la liaison de plusieurs cytokines à leurs récepteurs déclenche la phosphorylation et l'activation des kinases Janus (JAKs) et des protéines de signalisation et

d'activation des transcriptions (STATs) ; les dimères de STAT activent ensuite la transcription de gènes codant pour les facteurs de transcription de la TEM.

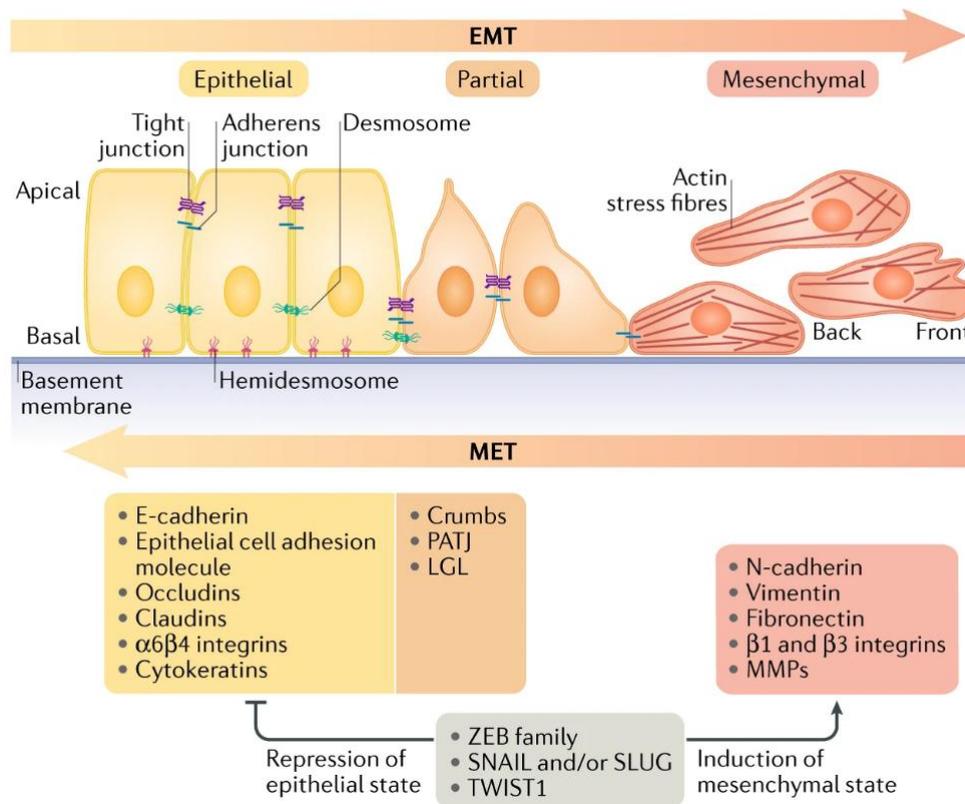
## 5. VIM, comme marqueur canonique de TEM

Les cellules cancéreuses exploitent la TEM pour acquérir la capacité de migrer, de résister aux agents thérapeutiques et d'échapper au système immunitaire. La vimentine est une protéine de 57 kDa largement exprimée et hautement conservée parmi les protéines de la famille des filaments intermédiaires de type III. L'expression de vimentine est observée dans divers types cellulaires, notamment les cellules de Sertoli, les cellules précurseurs neuronales, les fibroblastes, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les cellules tubulaires rénales, les macrophages, certains leucocytes et autres cellules stromales. La TEM se caractérise par l'expression des filaments intermédiaires de vimentine dans les cellules épithéliales, qui, en temps normal, n'expriment que des filaments intermédiaires de kératine. Inversement, au cours de la transition mésenchymo-épithéliale, les cellules reprennent un phénotype épithélial et montrent une diminution de l'expression de la vimentine associée à une motilité réduite [80].

En tant que protéine du cytosquelette, les filaments de vimentine soutiennent l'intégrité mécanique de la machinerie cellulaire migratoire, la modulation des plaques adhésions focales et l'attachement extracellulaire. En tant que structure viscoélastique, la vimentine confère aux cellules et à leurs organites une capacité de résistance au stress mécanique et un support flexible. De plus, au cours de la TEM, la vimentine module les facteurs de transcription tels que Snail, Slug, Twist et ZEB1/2, ainsi que les principaux facteurs épigénétiques de TEM [84]. De plus, la vimentine est capable de réprimer la différenciation cellulaire et augmenter leur potentiel pluripotent en induisant des gènes associés à l'auto-renouvellement, augmentant ainsi la capacité des cellules souches cancéreuses à se propager au sein de la tumeur et à résister aux traitements. Plusieurs mutations faux-sens et décalantes rapportées dans le gène de la vimentine pourraient également contribuer à la dissémination métastatique [85].

L'expression accrue de vimentine a ainsi été rapportée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales et tissus, incluant le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre, les tumeurs du système nerveux central, le mélanome et les cancers digestifs, tels que les cancers du pancréas, du côlon et du foie [80].

Concernant le système respiratoire, la vimentine est exprimée dans l'épithélium bronchique du fœtus et diminue avec l'âge au cours du développement, tandis que dans l'épithélium bronchique mature, son expression est principalement restreinte aux cellules basales. Dans les cancers bronchiques, la vimentine a été détectée dans les différents sous-types histologiques de CBNPC (figure 26). Notre équipe a précédemment démontré une expression accrue de vimentine dans les CBNPC faiblement différenciés [86]. La même publication rapportait également un risque de rechute après une chirurgie pour les patients opérés d'un CBNPC exprimant la vimentine.



**Figure 26 :** Représentation d'un programme de TEM avec ses principaux marqueurs selon le phénotype cellulaire (d'après [80]).

A ce jour, il n'existe cependant pas de traitement ayant démontré une efficacité en clinique et ciblant la vimentine [87]. Cela restreint la vimentine à un marqueur de TEM sans offrir une cible thérapeutique et justifie donc l'étude de co-marqueurs potentiellement ciblables.

## 6. AXL, comme co-marqueur de TEM et cible d'intérêt

La superfamille des récepteurs TAM, composée de TYRO3, AXL et MERTK, joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et immunitaire. Des dysfonctionnements dans le signallement des récepteurs TAM ont été associés à diverses maladies incluant cancer, la fibrose et les infections. La dysrégulation des récepteurs de la famille des TAM sont décrites comme favorisant la croissance et la dissémination tumorale [88].

Par exemple, les récepteurs TAM sont impliqués dans la TEM, le maintien du phénotype des cellules souches, la modulation immunitaire, la prolifération, l'angiogenèse et la résistance aux thérapies conventionnelles et ciblées. D'un point de vue thérapeutique, plusieurs inhibiteurs des récepteurs TAM sont en cours de développement en phase préclinique et clinique, ceux ciblant AXL étant les plus aboutis à ce jour.

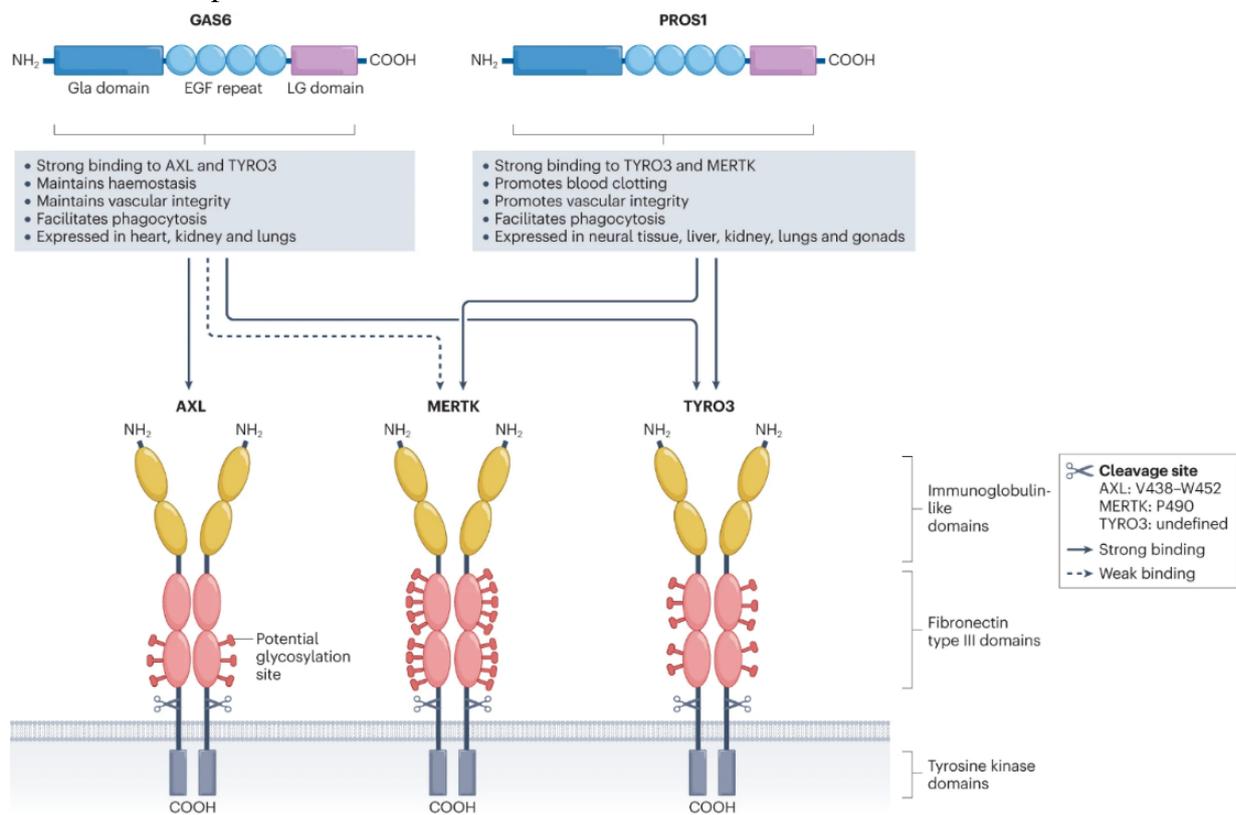
### 6.1. Structure moléculaire de AXL

De manière similaire à de nombreux autres récepteurs tyrosine kinases mi(RTK), transmembranaires les récepteurs TAM possèdent un domaine extracellulaire composé de deux

domaines immunoglobulines essentiels à la liaison des ligands, suivis de deux répétitions de type fibronectine III [89]. Le domaine kinase intracellulaire est hautement conservé entre les trois récepteurs, tous caractérisés par une séquence KWIAIES unique à cette famille de RTK.

## 6.2. Voies de signalisation médiées par AXL

Les récepteurs TAM sont activés par la protéine GAS6 (growth arrest-specific 6) et la protéine S1 dépendante de la vitamine K (PROS1) (figure 27). Les trois récepteurs AXL, MERTK et TYRO3, interagissent avec leurs ligands sous forme de dimères. Les ligands forment également des dimères et se lient aux domaines amino-terminaux de type immunoglobuline des récepteurs, qui sont connectés à deux domaines de type fibronectine III. Les domaines kinases intracellulaires des trois membres de la famille TAM partagent une homologie de séquence étroite et possèdent des sites d'autophosphorylation tout au long du domaine. Une coupure enzymatique peut se produire à proximité de la membrane cellulaire pour libérer des formes solubles des récepteurs TAM.



**Figure 27 :** Principaux ligands et récepteurs de la famille de TAM (d'après [90]).

La protéine GAS6, d'une taille de 75 kDa, se lie aux trois récepteurs TAM, avec une affinité de liaison la plus forte envers AXL, suivie de TYRO3 et une affinité la plus faible pour MERTK. L'expression d'AXL est régulée au niveau transcriptionnel en réponse à des stimuli externes. Par exemple, dans des conditions d'hypoxie, les cellules cancéreuses stabilisent les facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie 1 et 2 (HIF1 et HIF2) pour activer AXL et favoriser l'adaptation à une faible concentration en oxygène. En revanche, STAT1 régule l'ARNm d'AXL en aval de la signalisation TLR. Ainsi, différents stress peuvent réguler AXL. L'autophosphorylation des domaines catalytiques des récepteurs TAM favorise ensuite la

liaison à la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), aux membres de la famille SRC et à la protéine liée au récepteur du facteur de croissance 2 (GRB2), conduisant à l'activation de la voie de signalisation MEK–ERK.

### 6.3. AXL dans le CBNPC

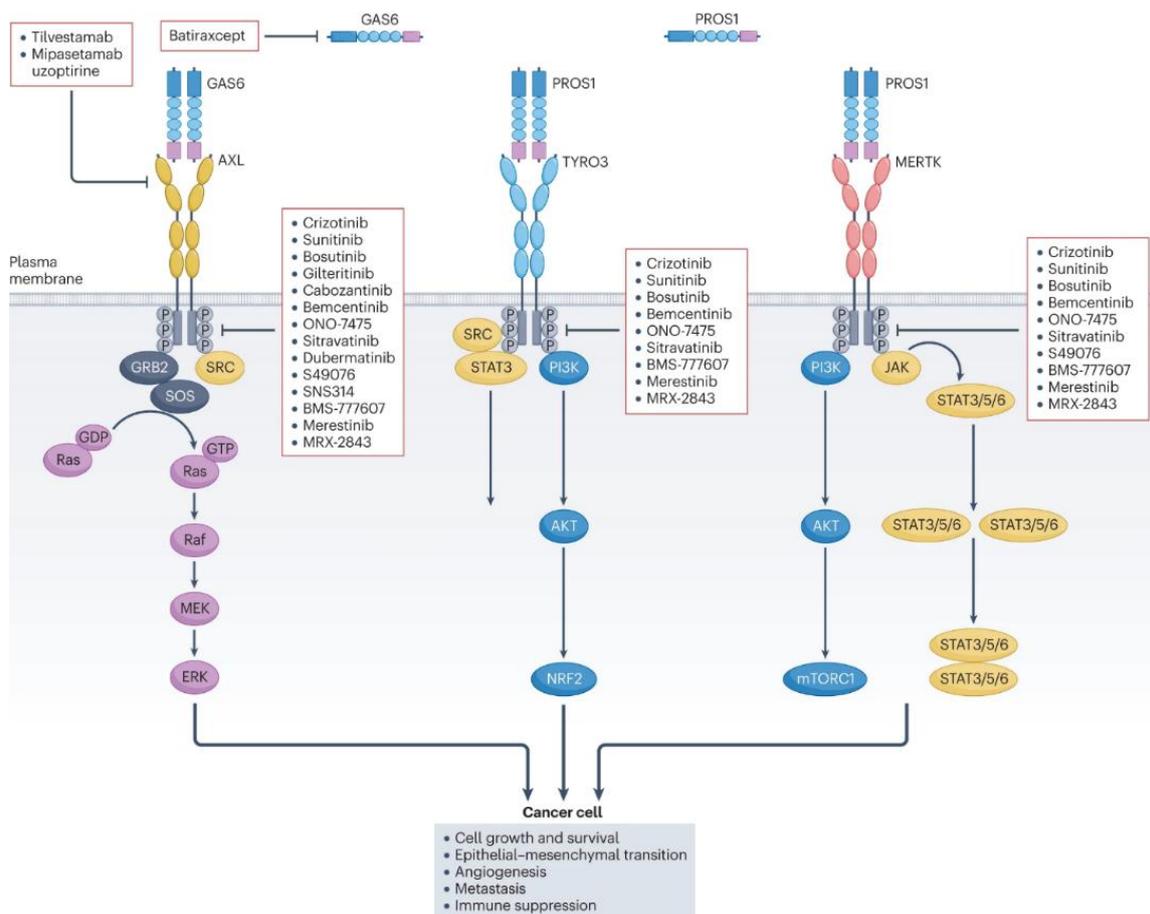
La dysrégulation de l'expression d'AXL a été observée dans divers cancers d'origines histologiques variées comme le mélanome, différents cancers du tractus digestifs, les néoplasies ORL ou encore le cancer du sein [91]. L'expression d'AXL a également été rapportée au niveau thoracique dans le mésothéliome [92] mais aussi dans le CBNPC. Dans le CBNPC, il a par exemple été rapporté qu'une expression de AXL dans plus de 25% des cellules tumorales étaient associées à un stade plus avancé dans des tumeurs opérées de stade précoce [93]. Dans une autre étude portant également sur des CBNPC de stade précoces, l'expression d'AXL évaluée cette fois par H-score était prédictive d'un risque de rechute [94]. Au stade métastatique avec mutation de l'EGFR, l'expression d'AXL a pu être décrite cette fois-ci comme mécanisme de résistance aux ITKs anti-EGFR [95,96].

En dépit d'une surexpression fréquente d'AXL dans de nombreux types tumoraux, les mutations génétiques et les événements d'amplification sont relativement rares. Les mutations, fusions et/ou amplifications d'AXL ne sont en effet retrouvées que dans 3 % des cas de cancer du sein, de carcinome épidermoïde ORL ou de CBNPC [97].

AXL facilite également la TEM. En effet, la signalisation intrinsèque d'AXL régule positivement les facteurs de transcription nécessaires à la TEM, notamment TWIST, ZEB1, ZEB2 et SLUG, et favorise également l'expression de N-cadhérine ainsi que la diminution de l'E-cadhérine pour faciliter la TEM ce qui a été rapporté dans le cancer du sein [98] ou encore dans le CBNPC [99]. De plus, AXL peut faciliter l'activation d'autres voies oncogéniques clés, telles que celles stimulées par MET, Src et Ras, ayant comme potentielle conséquence indirecte une induction de TEM.

### 6.4. AXL comme cible thérapeutique

À la suite de leur activation, les récepteurs TAM renforcent la prolifération des cellules cancéreuses, la survie des cellules tumorales et la formation tout comme la dissémination de métastase (figure 28). Ils stimulent également l'angiogenèse et contribuent à la suppression immunitaire. Sur le plan des inhibiteurs des TAM, on en distingue deux catégories : La première inclut des molécules de type ITK telles que le Crizotinib, le Sunitinib et le Bemcentinib, qui ciblent directement le domaine kinase des récepteurs TAM, inhibant ainsi leur activité kinase sans qu'ils ne soient spécifiques des RTKs TAM. La seconde catégorie, représentée par des agents tels que le Tilvestamab, le Mipasetamab uzopritine et le Batiraxcept, perturbe la liaison récepteur–ligand par une interaction de type anticorps bloquant plus spécifique [90].



**Figure 28** : Récepteurs de la famille TAM et leurs principaux inhibiteurs de type ITK ou anticorps bloquant (d'après [90]).

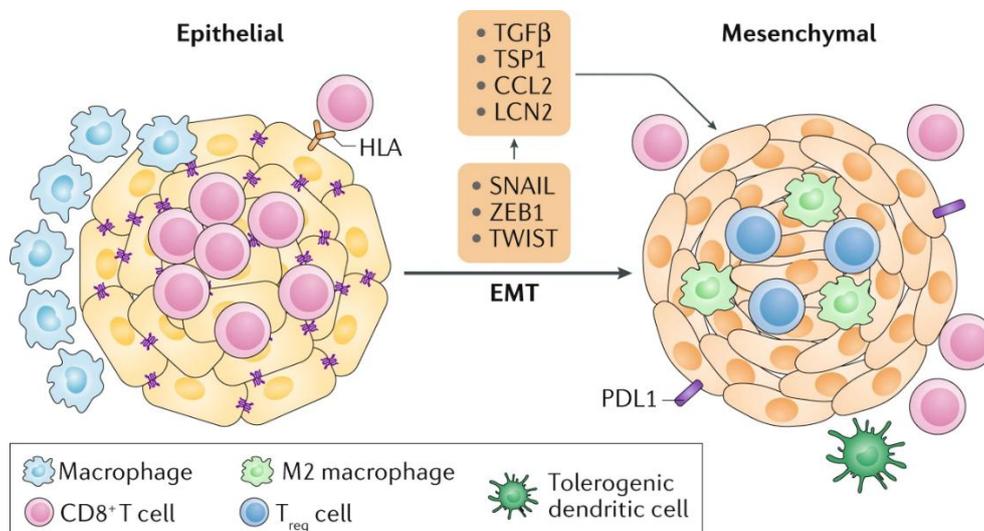
## 7. Rôle de la TEM et AXL dans la réponse à l'immunothérapie

Les possibilités d'implication de la TEM dans la réponse immunitaire sont intrinsèquement nombreuses. Dans ce manuscrit, il a par exemple déjà été discuté l'interrelation entre l'expression du PD-L1 et la voie des intégrines, elles-mêmes très liées à la TEM. Il a également été observé dans les carcinomes bronchiques pléomorphes, entité histologique illustrant la TEM, des niveaux de PD-L1 plus élevés que dans d'autres sous-types histologiques. Nous avons également pu observer que les tumeurs ayant un immunophénotypes excluant les cellules immunitaires de leur MET présentaient une activation de la voie du TGF $\beta$ , connu pour être l'inducteur principal de la TEM.

De plus, notre équipe a précédemment évalué dans le CBNPC de stade précoce, l'expression de PD-L1 et la TEM [100]. Parmi 188 patients ayant subi une résection chirurgicale pour un CBNPC, 127 adénocarcinomes et 61 carcinomes épidermoïdes ont été marqués pour l'expression de PD-L1 et de la vimentine. La survie globale a été comparée en fonction des statuts de PD-L1 et de la vimentine, à la fois séparément et conjointement, dans les bases de données du Tumor Cancer Genome Atlas. Des expressions élevées de PD-L1 et de vimentine étaient fortement associées (OR = 4,682,  $p < 0,0001$ ). Cette co-expression se produisaient préférentiellement dans les tumeurs avec invasion des ganglions lymphatiques ( $p = 0,033$ ). PD-L1 était significativement associé à des caractéristiques de TEM. De plus, les CBNPC

présentant à la fois des expressions élevées de PD-L1 et de vimentine étaient significativement associés à une survie globale plus courte ( $p = 0,019$ ). Une co-expression plus élevée de la vimentine et du PD-L1 permettait d'identifier les patients avec un pronostic défavorable.

Lorsque la TEM est induite dans les cellules carcinomateuses par les composants cellulaires du stroma, les cellules néoplasiques résultantes quasi-mésenchymateuses peuvent modifier la présence et activités de divers types cellulaires du MET (figure 29). Différents sous-types de cellules immunitaires innées et adaptatives peuvent ainsi influencer la progression tumorale. Certaines de ces cellules, telles que les lymphocytes T cytotoxiques CD8+, les cellules Natural Killer (NK) et les macrophages M1 activés, ont des fonctions antitumorales. Cependant, ces cellules immunitaires aux propriétés antitumorales sont souvent submergées par diverses cellules immunitaires agissant de manière opposée : les cellules T régulatrices immunosuppressives (cellules Treg), les macrophages M2 alternativement activés et les cellules suppressives myéloïdes (MDSC), qui suppriment directement les fonctions antitumorales des lymphocytes T et des cellules NK [101].



**Figure 29 :** Modification du microenvironnement immunitaire lors d'une TEM (d'après [80]).

Argument supplémentaire dans l'implication de la TEM dans l'échappement immunitaire, l'activation de la TEM induit une résistance accrue à l'élimination de ces mêmes cellules par les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ceci est par exemple rapporté dans le mélanome : les cellules de mélanome exprimant SNAIL sécrètent du TGFβ et la thrombospondine 1, favorisant la formation de cellules T régulatrices (Treg) tout en inhibant la capacité de présentation antigénique des cellules dendritiques [102]. Ces cellules de mélanome exprimant SNAIL sont également résistantes à l'immunothérapie, et l'abolition de SNAIL facilite la restauration de l'immunité antitumorale et la sensibilité à l'immunothérapie.

Ces effets immunosuppresseurs induits par la TEM ont également été observés dans d'autres types de carcinomes. Par exemple, des cellules de carcinome mammaire en état épithélial montrent une susceptibilité réduite à l'immunothérapie [103]. Les tumeurs épithéliales sont infiltrées par de nombreux lymphocytes T cytotoxiques CD8+, tandis que les tumeurs

mésenchymateuses contiennent des cellules Treg et des macrophages de type M2 immunosuppresseurs [104]. Les cellules carcinomateuses mésenchymateuses peuvent non seulement recruter des cellules immunosuppressives vers les tumeurs primaires, mais également protéger leurs homologues épithéliaux présents dans ces mêmes tumeurs contre une attaque immunitaire ultérieure.

Bien que ces études établissent clairement un lien entre le programme de la TEM et l'échappement immunitaire, les mécanismes précis conférant aux cellules carcinomateuses mésenchymateuses une résistance à l'attaque immunitaire restent encore incertains. Comme mentionné précédemment, les cellules carcinomateuses subissant la TEM sécrètent de grandes quantités de TGF $\beta$ , connu pour ses effets immunosuppresseurs [105]. Le TGF $\beta$  est nécessaire à l'induction des cellules Treg et atténue les activités cytolytiques des cellules NK [106,107]. Il est plausible que cette sécrétion de TGF $\beta$  associée à la TEM soit accompagnée de la sécrétion d'une multitude d'autres cytokines et chimiokines agissant de manière autocrine ou paracrine pour réguler les activités des cellules immunitaires présentes dans le MET. Par exemple, les cellules de mélanome exprimant SNAIL sécrètent la chimiokine CCL2, qui agit de manière autocrine pour déclencher la libération de la lipocaline 2 (LCN2). La CCL2 et la LCN2 coopèrent ensuite pour générer des cellules dendritiques régulatrices [108]. Celles-ci expriment des niveaux faibles de molécules co-stimulatrices, nécessaires pour la présentation antigénique aux cellules T, tout en exprimant des molécules immunosuppressives telles que le PD-L1, ce qui entraîne une atténuation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T. De plus, SNAIL a également été identifié pour activer directement la transcription d'autres cytokines et chimiokines, y compris TNF et CCL5 [109].

En plus de déclencher la libération de cytokines et chimiokines immunorégulatrices, l'induction de TEM atténue les activités cytolytiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en induisant l'autophagie [110]. De plus, l'activation du programme de TEM altère le processus de priming des lymphocytes T [103]. D'autres mécanismes d'évasion immunitaire incluent l'altération de l'affichage en surface cellulaire de marqueurs immunomodulateurs, permettant ainsi aux cellules tumorales d'échapper à l'immunosurveillance. Par exemple, l'induction de TEM conduit à une diminution de l'affichage en surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et/ou des molécules HLA dans les mélanomes, nécessaires pour la présentation des antigènes aux lymphocytes T [111]. Ainsi, en diminuant l'expression de CMH-I, les cellules tumorales peuvent échapper aux fonctions cytolytiques des lymphocytes T. L'ensemble de ces données suggère fortement une association entre la TEM et l'altération de la présentation antigénique médiée par le CMH et/ou le HLA.

Concernant AXL, l'interrelation entre AXL et une résistance à l'immunothérapie semble également importante. Il a par exemple été rapporté dans un modèle ex vivo de plusieurs lignées de cancer bronchiques humain que l'expression d'AXL induite par hypoxie était augmentée dans les clones mésenchymateux [112]. L'expression d'AXL dans les cellules tumorales était corrélée à une résistance intrinsèque accrue des cellules cancéreuses à la destruction par les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. Un TKI ciblant AXL a permis de restaurer une sensibilité des cellules cancéreuses mésenchymateuses à la destruction médiée par les lymphocytes

cytotoxiques. La restauration de la sensibilité immunitaire dépendante de AXL impliquait l'activation de NF- $\kappa$ B, une augmentation de l'expression d'ICAM1 et une régulation à la hausse de l'expression de ULBP1 couplée à une inhibition de MAPK. Des résultats similaires étaient observés dans un modèle de cancer bronchique murin [113]. Il y était notamment observé que l'inhibition d'AXL induisait une modification du MET immunitaire, entraînant une augmentation de la prolifération, de l'activation et de la fonction effectrice des cellules T CD4+ et CD8+ intra-tumorales, possiblement à travers l'accumulation préférentielle et l'activation des cellules dendritiques cross-présentatrices CD103+. De façon intéressante, un autre modèle de cancer bronchique résistant à l'immunothérapie avec mutation de STK11 démontrait la restauration d'une sensibilité à l'immunothérapie après inhibition d'AXL [114].

D'un point de vue clinique, une seule étude clinique évaluant AXL est disponible à ce jour concernant des patients traités par immunothérapie. L'expression tumorale d'AXL a été évaluée dans des carcinomes rénaux à cellules claires provenant de 316 patients métastatiques et traités par Nivolumab dans le cadre de l'essai GETUG AFU 26 NIVOREN après échec d'une thérapie anti angiogénique. Ces résultats montrent qu'un niveau élevé d'expression d'AXL dans les cellules tumorales est associé à des taux de réponse inférieurs et à une tendance à une survie sans progression plus courte après le traitement par anti-PD-1 [115]. L'expression d'AXL était fortement associée à l'expression tumorale de PD-L1. De plus, les patients ayant des tumeurs présentant une expression concomitante de PD-L1 et une expression élevée d'AXL avaient une survie globale plus courte.

## **OBJECTIFS DE RECHERCHE**

### **I. Hypothèses de recherche et questions posées**

Les hypothèses de cette thèse reposent donc sur le constat clinique d'une résistance primaire ou secondaire à l'immunothérapie et le double besoin d'identifier des biomarqueurs prédictifs d'une résistance à l'immunothérapie voire des cibles thérapeutiques permettant d'optimiser les stratégies thérapeutiques immuno-médiées. Basé sur la littérature et nos travaux préliminaires, nous avons émis l'hypothèse que la TEM pourrait être un processus biologique témoignant d'une moindre sensibilité aux traitements à base d'immunothérapie dans le CBNPC.

### **II. Objectifs de l'étude**

Notre travail comporte comme objectif principal d'affirmer ou infirmer la TEM comme biomarqueur potentiel prédictif d'une réponse à l'immunothérapie. Les objectifs secondaires sont quant à eux de rechercher les mécanismes par lesquels la TEM peut influencer sur la réponse immunitaire anti-cancéreuse, identifier les marqueurs de TEM les plus pertinents pour une application en clinique et surtout d'identifier parmi eux une potentielle cible thérapeutique qui pourrait permettre de restaurer une sensibilité, voire de prévenir une résistance à l'immunothérapie.

## RESULTATS

### I. Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse associés à un profil immunitaire dans le CBNPC localisé

#### 1. Résumé

Le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC) reste un défi en oncologie, malgré les avancées en immunothérapie. Actuellement, l'immunothérapie pour le CBNPC métastatique est basée sur l'expression de PD-L1, un marqueur imparfait qui ne permet pas à tous les patients de bénéficier du traitement. Récemment, l'immunothérapie combinée à la chimiothérapie a montré des bénéfices pour les stades précoces et opérables du CBNPC, mais cette stratégie ne réussit pas pour plus de 60 % des patients, et peut même être dangereuse en cas de résistance tumorale.

La TEM, un processus conférant aux cellules épithéliales des caractéristiques mésenchymateuses, joue un rôle crucial dans la progression du cancer et l'évasion immunitaire. L'identification de marqueurs de TEM liés à des profils immunitaires spécifiques est donc essentielle. Vimentine (VIM) et AXL sont deux marqueurs mésenchymateux importants, associés à la TEM, à l'invasion et à la progression tumorale. Des études ont montré une forte interrelation entre VIM, AXL et PD-L1, suggérant que la TEM pourrait influencer l'évasion immunitaire.

Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que l'expression de AXL et/ou VIM dans le CBNPC pourrait servir de substituts pour les signatures de TEM et être utilisés comme indicateurs prédictifs de résistance à l'immunothérapie anti-PD(L)1. Notre étude explore cette association en utilisant trois bases de données indépendantes d'ARN de CBNPC à un stade précoce, dont deux avec des cas de CBNPC réséqués chirurgicalement.

Les données d'expression génique de 120 lignées cellulaires de CBNPC ont été obtenues via cBioPortal. Les données pour 564 adénocarcinomes pulmonaires (LUAD-TCGA) et 545 épidermoïdes pulmonaires (LUSC-TCGA) ont été téléchargées depuis TCGA, en incluant uniquement les patients avec une confirmation pathologique de CBNPC, des informations histologiques détaillées et des données complètes d'expression d'ARNm, excluant les tissus normaux. Cela a abouti à 503 adénocarcinomes et 502 épidermoïdes. Des informations supplémentaires, telles que la charge mutationnelle tumorale (TMB) et le statut mutationnel, ont été incluses lorsque disponibles.

Les listes de gènes des chimiokines et des cytokines ont été téléchargées depuis ImmPort. Le score d'inflammation a été calculé, basé sur l'expression de 27 gènes liés à l'inflammation précédemment publiés. L'activation chronique de l'IFN $\gamma$  a été évaluée via le score TIDE. Les points de contrôle immunitaires d'intérêt, tels que LAG3, IDO1 et TIGIT, ont été sélectionnés d'après la littérature.

Les gènes différenciellement exprimés ont été analysés avec l'outil REACTOME, avec analyse statistique pour identifier les voies enrichies.

La signature IPRES et l'algorithme TIDE, qui évalue le potentiel d'évasion immunitaire basé sur le profil d'expression génique de la tumeur ont permis d'évaluer la sensibilité à l'immunothérapie. La signature TIDE combine plusieurs signatures liées à la réponse immunitaire pour identifier les échantillons susceptibles de répondre à l'immunothérapie.

Les principales conclusions de l'étude sont les suivantes (Figure 30). Une signature de TEM de 62 gènes a été établie et validée pour distinguer les tumeurs épithéliales et mésenchymateuses dans le CBNPC. Cette signature a identifié des groupes de tumeurs avec des traits mésenchymateux ou épithéliaux, les tumeurs mésenchymateuses présentant des niveaux élevés d'expression des gènes tels que VIM, AXL et ZEB1. Le score TEM, basé sur cette signature, a montré une forte capacité à prédire le statut TEM avec une AUC de 0.993.

Les tumeurs mésenchymateuses affichaient un profil immunitaire spécifique. Une analyse des profils d'expression des chimiokines et cytokines a révélé que les tumeurs mésenchymateuses présentaient des signatures immunitaires distinctes, notamment une implication significative de la signalisation de l'IL-10. L'expression de plusieurs inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, y compris PD-L1, CTLA4, LAG3, TIGIT, et IDO1, était positivement corrélée avec le phénotype mésenchymateux.

La co-expression de AXL et VIM distingue les sous-types TEM du NSCLC. Les tumeurs coexprimant AXL et VIM présentaient des scores TEM plus élevés et étaient associées à une moindre sensibilité à l'immunothérapie. Ces résultats suggèrent que la co-expression de AXL et VIM peut servir de marqueur pour prédire la réponse à l'immunothérapie, avec des tumeurs AXL<sup>élevé</sup>/VIM<sup>élevé</sup> montrant une résistance accrue. L'analyse TIDE et IPRES a confirmé que les tumeurs AXL<sup>élevé</sup>/VIM<sup>élevé</sup> avaient une probabilité plus élevée de résistance immunitaire, avec des scores prédictifs robustes.

Cette étude met en évidence l'interaction complexe entre la TEM, l'évasion immunitaire et la réponse à l'immunothérapie dans le CBNPC. La co-expression d'AXL et de la vimentine est cruciale en immunologie anti-cancéreuse, suggérant que des approches thérapeutiques personnalisées ciblant les tumeurs mésenchymateuses pourraient en améliorer l'efficacité. Une validation en condition clinique est nécessaire. La co-expression d'AXL et de la vimentine prédit une mauvaise réponse à l'immunothérapie dans le CBNPC, pouvant potentiellement guider les stratégies thérapeutiques.

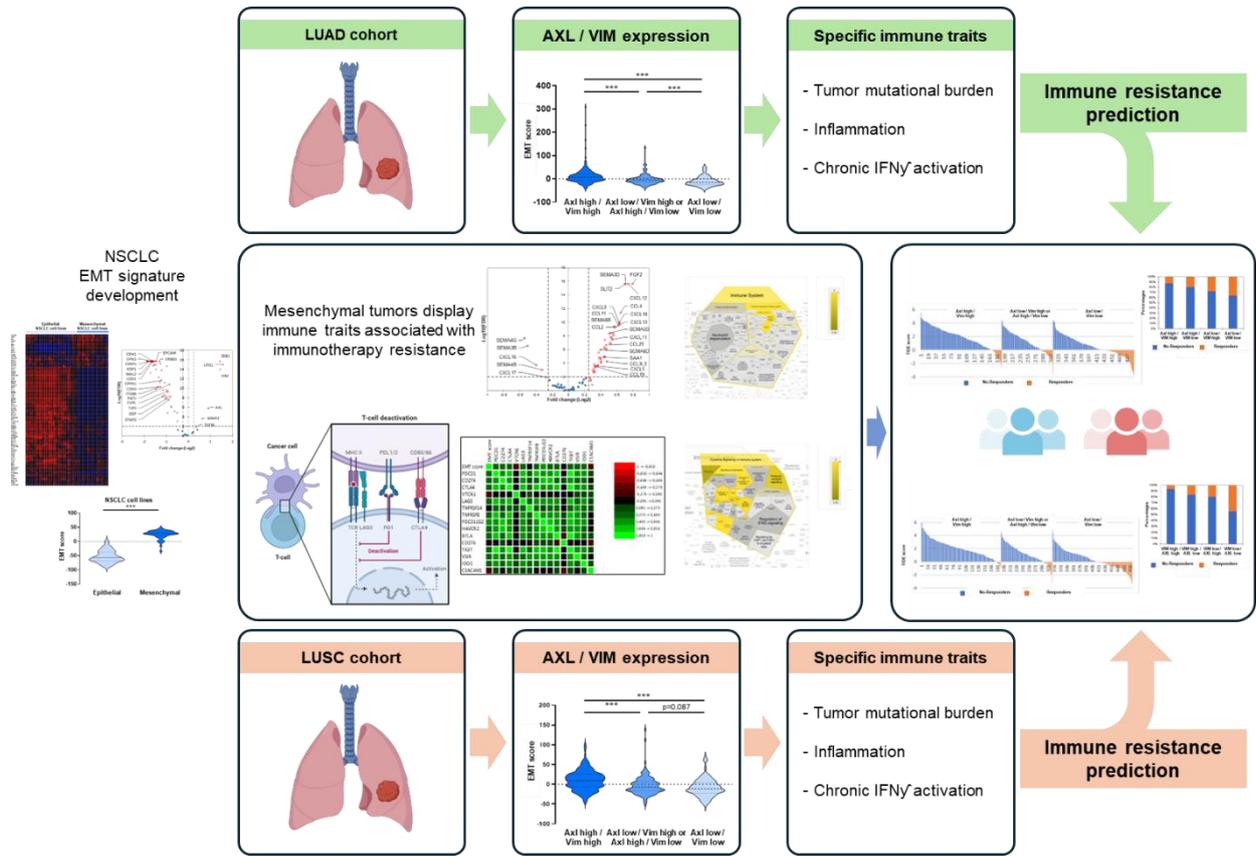


Figure 30 : Graphical abstract

## 2. Article scientifique

*Thèse sur article :*

### **AXL and vimentin as surrogates for epithelial-mesenchymal transition to predict immunotherapy sensitivity in localized NSCLC**

*In submission*

#### **Authors**

**Julien Ancel<sup>1,2,#</sup>, Béatrice Nawrocki-Raby<sup>1</sup>, Véronique Dalstein<sup>1,3</sup>, Valérian Dormoy<sup>1</sup>, Anne Durlach<sup>1,3</sup>, Gaëtan Deslée<sup>1,2</sup>, Christine Gilles<sup>4,\*</sup> and Myriam Polette<sup>1,3,\*</sup>**

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell, UMR-S 1250, Reims, France

<sup>2</sup> CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Service de Pneumologie, Reims, France

<sup>3</sup> CHU Reims, Pôle de Biologie Territoriale, Service de Pathologie, Reims, France

<sup>4</sup> University of Liège, GIGA Cancer, Laboratory of Tumor and Development Biology, Liège, Belgium

\*contributed equally

**#Corresponding author:** Julien Ancel, INSERM UMR-S 1250, Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims, France. E-mail address: [jancel@chu-reims.fr](mailto:jancel@chu-reims.fr)

**Keywords:** non-small cell lung cancer, immunotherapy, Epithelial-mesenchymal transition, AXL, Vimentin, Biomarker.

## Abstract

**Background:** Immunotherapy has transformed NSCLC treatment, yet response variability persists. Understanding factors influencing immunotherapy response, particularly perioperatively, is crucial. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) correlates with tumor invasiveness and immune resistance. This study examines EMT, focusing on AXL and vimentin in NSCLC immune evasion.

**Methods:** Gene expression data from NSCLC cell lines, LUAD, and LUSC were analyzed. EMT traits, AXL and vimentin co-expression, immune checkpoint inhibitor expression, and sensitivity profiles were assessed.

**Results:** Analysis revealed distinct immune profiles between epithelial and mesenchymal tumors, with notable cytokine and chemokine differences, including significant IL-10 signaling crucial in immunotherapy response. Mesenchymal specimens showed altered immune checkpoint inhibitor expression, suggesting immune evasion. AXL and vimentin co-expression identified unique EMT subgroups, linked to elevated immune checkpoint inhibitor levels and an immuno-suppressive microenvironment. AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors consistently had reduced immunotherapy sensitivity.

**Conclusion:** This study highlights the complex interplay between EMT, immune evasion, and immunotherapy response in NSCLC. AXL and vimentin co-expression are crucial in cancer immunology, suggesting tailored therapeutic approaches targeting mesenchymal tumors could enhance efficacy. Validation through trials is necessary. AXL and vimentin co-expression predicts poor immunotherapy response in NSCLC, guiding personalized treatment strategies and improving outcomes.

## Introduction

Lung cancer, particularly non-small cell lung cancer (NSCLC), remains a challenge in oncology. While advancements in immunotherapy have revolutionized cancer treatment, including NSCLC, not all patients respond equally to these therapies [116]. Currently, the prescription of immunotherapy, particularly in monotherapy for metastatic NSCLC, depends on the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) by tumor cells. Nevertheless, this marker remains imperfect, and many patients do not experience benefits from immunotherapy [117]. Very recently, immunotherapy has also revolutionized early and operable NSCLC stages. Based on data from various studies, including Checkmate 816 [39], Keynote 671 [118], and AEGAN [119], anti-PD(L)1 immune checkpoint inhibitors combined with chemotherapy offer perioperative benefits, enhancing rates of pathological responses as well as event-free survival. However, this strategy is not beneficial for all patients. Over 60% of them will not achieve a major pathological response, which is a crucial predictive factor for postoperative survival [120]. Even more dramatically, exposure to immunotherapy may escalate to become hazardous, potentially fostering tumor progression in cases of tumor resistance, observed in 5 to 8% of cases. Identifying markers/signatures that could predict immunotherapy response is thus crucial for tailoring treatment strategies [121].

The phenomenon of epithelial-mesenchymal transition (EMT) has gained significant attention in the context of cancer biology [122]. EMT is a complex process that provides epithelial cells with mesenchymal characteristics associated with increased motility and invasiveness [123]. While EMT plays a vital role in embryonic development and tissue repair, its dysregulation has been linked to cancer progression and immune evasion [124]. The clinical significance of EMT has also been documented in many solid cancers, such as breast and prostate cancers [115,125–127]. More particularly, recent findings have highlighted the intricate interplay between EMT and the immune microenvironment. Establishing a potential link between EMT and the immune response in NSCLC has emerged as a crucial focus in cancer research [128,129].

In this context, identifying reliable EMT markers linked to specific immune profiles and immunotherapy response is of paramount importance. Vimentin (VIM), a type III intermediate filament protein, is acknowledged as a prototypical mesenchymal marker and has extensively been associated with EMT, increased tumor invasiveness, and progression [130]. AXL is a receptor tyrosine kinase intricately linked to various cellular processes, including cell growth, survival, and migration, [89,131]. AXL, which is both a target and a regulator of EMT processes, is gaining major interest in basic and clinical cancer research. Previous studies have not only demonstrated the prognostic significance of AXL [132] and VIM [86] in NSCLC but have also uncovered a strong interrelationship between VIM or AXL and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) [100,133], suggesting a potential mechanism through which EMT may influence tumor immune escape mechanisms. Additionally, it is worth noting that inhibitors targeting AXL are currently under development [131,134]. Thus, AXL possesses the dual advantage of characterizing a specific population and potentially offering a precise intervention in clinically relevant scenarios. This dual role positions AXL as a promising candidate for tailored therapeutic strategies.

In the current clinical context, which is gradually integrating immunotherapy into the perioperative management of early NSCLC but lacks predictive factors of efficiency, we hypothesize that the examination of AXL and/or VIM expression in NSCLC tumors could serve as surrogates for EMT signatures and could potentially be utilized as predictive indicators of resistance to anti-PD(L)1 immunotherapy.

Our study investigates the association between EMT, AXL, and VIM expressions, and mesenchymal signatures, exploring their potential relationship with tumor immune sensitivity. The study is conducted across three independent published RNA databases of early-stage NSCLC, including two with surgically resected NSCLC cases.

## **Materials and methods**

### ***NSCLC cell lines, Lung Adenocarcinoma, and Lung Squamous Cell Carcinoma datasets***

Gene expression data for 120 NSCLC cell lines were obtained from the cBioPortal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), excluding Large Cell Carcinoma (n = 18), Lung Carcinoid (n = 4), and other cell lines with insufficient histological subtype information. Transcript data for Lung Adenocarcinoma (LUAD-TCGA; n = 564) and Lung Squamous Cell Carcinoma (LUSC-TCGA; n = 545) were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) along with associated clinical and biological features, available at: <https://portal.gdc.cancer.gov> [135]. Patients were included based on the following criteria: a) pathologically confirmed NSCLC; b) detailed histological subtype information available; and c) complete mRNA expression data. Data from normal (non-tumoral) tissues were excluded. This resulted in the inclusion of 503 and 502 NSCLC patients with stage I-IV disease for LUAD-TCGA and LUSC-TCGA, respectively. Additional data, such as Tumor Mutational Burden (TMB) and mutational status for genes of interest, were downloaded when available.

### ***Expression signatures of immune-related profiles***

Chemokines and cytokines genes lists were downloaded from the open access platform : <https://www.immport.org/shared/genelists>. and are provided in supplemental Table 1 [136].

The inflammation score was determined following the method described by Thompson *et al.* [137]. This score was calculated by summing (unweighted) log<sub>2</sub> z-scores for 27 inflammation-related genes, which included CCL5, CD3D, CD8A, IDO1, and STAT1.

Evaluation of chronic IFN $\gamma$  activation was derived from the TIDE score (as explained below). The selection of immune checkpoints of interest was based on the existing literature and focused on checkpoints that are currently of special interest in clinical practice, including LAG3, IDO1, and TIGIT [138].

### ***Functional enrichment analysis of the differentially expressed genes***

The Differentially Expressed Genes (DEGs) were entered into the pathway browser and analysis tool available from REACTOME (<https://reactome.org/>) [139]. A statistical test based

on hypergeometric distribution was employed to determine whether specific Reactome pathways were over-represented (enriched) in the submitted data. The analysis was filtered to exclusively display results for the 'Homo sapiens' species. The generated figures provide a comprehensive genome-wide overview of the pathway analysis results.

### ***Prediction of sensitivity to immunotherapy***

The Innate Anti-PD-1 Resistance (IPRES) signature was established by summing the log<sub>2</sub> Z-scores of 16 reported genes, as detailed in Supplemental Table 2 [140].

In order to predict immunotherapy sensitivity, we also employed the Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) algorithm, accessible at <https://tide.dfci.harvard.edu>. This computational framework assesses the potential for tumor immune escape based on the gene expression profile of the tumor [141]. The gene panel list was downloaded and encoded using <https://syngoportal.org/convert.html> (Supplemental Table 2) [142]. The TIDE signature identifies samples with a high probability of response by amalgamating multiple independent signatures related to immune response. These include signatures of T-cell-inflamed infiltration, CD8 and cytotoxic T lymphocyte infiltration, tumor T-cell dysfunction, tumor T-cell exclusion, Myeloid-Derived Suppressor Cells infiltration, Cancer-Associated Fibroblast infiltration, Tumor-Associated Macrophages M2 infiltration, and chronic IFN $\gamma$  activation [143].

### ***Statistics***

Bars in scattergrams represent the median and each dot represents one sample. Classification based on AXL and/or VIM expression (high or low) was determined using the median expression values (i.e. RPKM). Categorical feature associations were assessed using the chi-square test. The Normality of data distribution was confirmed using the Kolmogorov test. To assess the significance between different conditions, quantitative data were analyzed using parametric tests, such as the Student's t-test or ANOVA with Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc tests for multiple subgroup comparisons where applicable ( $p < 0.05$  was considered significant). The Spearman test was employed to examine linear correlations. ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were generated using logistic regression. DEG analysis of chemokine and cytokine-related genes was performed using the Benjamini-Hochberg procedure for post hoc corrections. The threshold for DEGs was set to |fold change|  $> 1.2$  and a p-value  $< 0.01$ . Waterfall plots of the TIDE scores were plotted to distinguish "non-responders" and "responders," defined by a positive or negative TIDE score, respectively. For data analysis and reformatting, XLSTAT software (version 2022.4.1, Addinsoft company, Paris, France) was utilized.

## Results

### *Development and validation of an EMT signature in NSCLC*

Initially, we sought to establish a valid EMT signature that could be used to distinguish “epithelial” and “mesenchymal” tumors both in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung.

To evaluate the EMT characteristics of NSCLC tumors, we first utilized a 75-gene expression signature associated with EMT in a previous study (GSE4824), which was derived from the comparison of NSCLC cell lines [144]. One gene (TMEMB30) was excluded due to the unavailability of mRNA expression data. To improve external validity, we also cross-referenced this 74-gene-associated EMT signature with 2 other previously published EMT signatures [145,146] expanding the list to 78 potentially relevant EMT-related genes, most of the genes being similar between the 3 EMT signatures. Using cBioPortal [147], we generated a heatmap that clustered NSCLC cell lines based on their mRNA profiles for these 78 EMT-related genes, allowing the identification of mesenchymal and epithelial-like components (Fig 1A).

We then validated this 78 gene expression signature in 120 NSCLC cell lines and performed an unsupervised clustering based on mRNA expression for each gene. This classification identified two groups: one group of 48 NSCLC cell lines with mesenchymal traits (e.g. expressing ZEB1, VIM, AXL, TGF $\beta$ 1) and another group of 72 NSCLC cell lines with epithelial features (e.g. expressing CDH1, EPCAM, CDH3, DSP) (Fig 1A). We next identified 62 genes that were significantly and systematically differentially expressed between these two EMT subgroups (Fig 1B).

This restricted EMT signature of 62 genes was then used to construct an EMT score: we calculated a log<sub>2</sub> unweighted z-score by adding the mRNA expression counts of mesenchymal genes (n = 7) and subtracting the sum of mRNA expression counts of epithelial genes (n = 55). This EMT score was represented as a continuous value, specifically the log<sub>2</sub> value of reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM). Samples exhibiting higher EMT scores, as calculated, were regarded as harbouring increased mesenchymal phenotypes. The list of selected genes and their related EMT traits is provided in Supplemental Table 3. This resulted in samples with higher EMT scores reflecting a mesenchymal phenotype. We then validated the EMT score in this NSCLC cell line dataset (n = 120) observing that mesenchymal-like NSCLC cell lines exhibited higher EMT scores than epithelial-like NSCLC cell lines (p < 0.0001, Fig 1C). The EMT score also demonstrated a high ability to predict EMT status (AUC 0.993, Supplemental Fig 1).

The restricted EMT signature of 62 genes was then applied to 503 lung adenocarcinoma (LUAD) and 502 lung squamous carcinoma (LUSC) RNA datasets from the TCGA. Similar results were observed for both histological subtypes. Through unsupervised classification, the restricted EMT signature differentiated epithelial- from mesenchymal-like tumors, the latter expressing mesenchymal-related genes such as VIM, AXL, and ZEB1 (Supplemental Table 4). Mesenchymal-like tumors in both LUAD and LUSC cohorts exhibited higher levels of EMT scores as expected (p < 0.0001, Fig 1D, F) and, as evaluated by ROC curve analysis, the EMT

score harbored a good ability to predict EMT status in both cases (Fig 1E, 1G, Supplemental Fig 2).

### ***Mesenchymal Tumors Harbor a Specific Immune Profile***

To evaluate a potential relationship between EMT and immune resistance, we first delved into the immune features distinguishing mesenchymal and epithelial tumors. As the response to immunotherapy notably relies on the expression of chemokines and cytokines, with Interleukin-10 (IL-10) playing a predominant role, we tested our EMT classification against these two classes of molecules.

First, we conducted unsupervised clustering based solely on the expression of chemokines ( $n = 102$ ) on the 503 LUAD and 502 LUSC samples from the TCGA, thereby clearly identifying two groups. Interestingly, although the classification was performed independently of any genes associated with EMT, we observed a strong association between the clusters defined by the chemokine signature and the EMT subgroups (OR=2.670,  $p < 0.0001$ ; OR=1.605,  $p = 0.008$ , respectively) (data not shown). This reaffirmed that mesenchymal NSCLC specimens exhibit a distinct immune profile. Next, we examined the signatures of chemokines and cytokines ( $n = 456$ ) in relationship with the EMT score. In LUAD, 61 genes encoding chemokines were found to be differentially expressed in epithelial versus mesenchymal-like tumors (Fig 2A). The functional enrichment analysis for these 61 DEGs highlighted categories related to the immune functions ( $p < 0.05$ ) and, more specifically associated to cytokine signaling (Fig 2B). Focusing on cytokines, 111 DEGs distinguished mesenchymal and epithelial LUAD tumors (Fig 2C; Supplemental Table 5). The functional enrichment analysis of these 111 DEG revealed significant involvement of IL-10 signaling, with 22 out of 86 genes related to this pathway (ratio 0.006, FDR  $< 0.0001$ ; Fig 2D; Supplemental Table 6).

We found similar results in LUSC with 54 DEG encoding chemokines enriched in the cytokine signaling function ( $p < 0.05$ ; Fig 2E-F). Focusing on cytokines, we identified 204 cytokine-related genes that were dysregulated between mesenchymal and epithelial LUSC tumors (Supplemental Table 7). Remarkably, functional enrichment analysis also highlighted a close relationship with IL-10 signaling, which was the most significant pathway identified, involving 29 out of 86 genes (ratio 0.006, FDR  $< 0.0001$ ; Fig 2G-H; Supplemental Table 8).

### ***The EMT status exhibits positive correlations with numerous immune checkpoint inhibitors.***

Given the demonstrated variability in cytokine and chemokine signatures based on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status, it is warranted to investigate the expression levels of multiple clinically relevant immune checkpoint inhibitors in immunology. This aims to elucidate potential associations between EMT status and the immune checkpoint inhibitors, influencing immunotherapeutic responsiveness.

Interestingly, the EMT phenotype was significantly associated with CD274 (i.e., PD-L1) mRNA levels (Fig 3A). In addition to PD-L1 expression, which is positively associated with mesenchymal traits, we explored the mRNA expression of other key immune checkpoint

inhibitors such as PD-1, CTLA4, LAG3, TIGIT, and IDO1 (Fig 3A). Interestingly, we observed that mesenchymal phenotype, as reflected by a higher EMT score, was significantly associated with many of these immune checkpoint inhibitors, including PDL2 ( $r=0.420$ ,  $p < 0.0001$ ), TNFRSF8 ( $r=0.399$ ,  $p < 0.0001$ ), LAG3 ( $r=0.270$ ,  $p < 0.0001$ ), CTLA4 ( $r=0.251$ ,  $p < 0.0001$ ), and TIGIT ( $r=0.248$ ,  $p < 0.0001$ ) (Supplemental Table 9). Positive correlation with so many immune checkpoint co-inhibitors suggests common immune escape for mesenchymal tumors.

For LUSC, similar results were broadly observed. Mesenchymal LUSC significantly co-expressed many other immune checkpoint inhibitors than PD-L1, including CTLA4 ( $r=0.251$ ,  $p < 0.0001$ ), TIGIT ( $r=0.389$ ,  $p < 0.0001$ ), PD-1 ( $r=0.366$ ,  $p < 0.0001$ ), BTLA ( $r=0.369$ ,  $p < 0.0001$ ), and LAG3 ( $r=0.322$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig 3B; Supplemental Table 9).

### ***AXL and VIM Co-Expression distinguishes NSCLC EMT subtypes***

The results described above strengthened our idea to examine further the potential clinical interest of EMT in predicting immune profiles and responses to treatment. Considering the necessity to facilitate EMT characterization in clinical routine, we first endeavoured to identify two main genes that could efficiently recapitulate the EMT signature. Vimentin, which is recognized as the canonical marker of EMT, was selected. Additionally, we chose to incorporate AXL, a marker of growing interest in clinical oncology, which offers the dual advantage of being associated with EMT and potentially targetable by drugs if its relevance is established (Supplemental Fig 2 A-B). Supportively, mesenchymal LUAD tumors exhibited significantly higher mRNA levels of VIM and AXL ( $p < 0.0001$ , Fig 4 A-B). Exploring this association deeper, AXL and VIM co-expression identified 3 distinct subgroups with differential EMT scores. AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors had significantly higher scores than AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> specimens ( $p < 0.0001$ ) and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD tumors ( $p < 0.0001$ ; Fig 4C). A strong positive correlation was noted between AXL and VIM ( $r=0.689$ ,  $R^2=0.474$ ,  $p < 0.0001$ , Fig 4D). To simplify the EMT predictive model, we tested AXL and VIM co-expression as predictors of EMT status defined by the restricted EMT signature, and we observed good reliability in EMT prediction based on AXL and VIM co-expression (AUC=0.704, Fig 4E).

Similar results were obtained for LUSC tumors. Epithelial subgroups from the LUSC cohort expressed lower levels of VIM and AXL mRNA ( $p < 0.0001$ , see Fig 4 F-G). Based on AXL and VIM co-expression, three subgroups were identified according to their EMT score. AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors had significantly higher EMT scores than AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> specimens ( $p < 0.0001$ ), as well as AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUSC tumors ( $p < 0.0001$ ; Fig 4H). The same strong correlation was observed between AXL and VIM co-expression ( $r=0.727$ ,  $R^2=0.527$ ,  $p < 0.0001$ , Fig 4I), displaying good reliability in predicting EMT status based solely on AXL and VIM co-expression (AUC=0.739, Fig 4J).

### ***Mesenchymal tumors display immune traits associated with immunotherapy resistance***

Having established a clinically applicable characterization of EMT relying on the expression of AXL and VIM, and acknowledging the biological alterations of chemokine and cytokine-related pathways linked to EMT, (such as IL10, a pivotal signaling pathway in immune

response), we proceeded to assess several clinically relevant traits that have shown association with immunotherapy resistance.

CD274 showed significant co-expression with AXL in both LUAD ( $r=0.413$ ,  $R^2=0.169$ ,  $p < 0.0001$ ) and LUSC tumors ( $r=0.190$ ,  $R^2=0.034$ ,  $p < 0.0001$ ) (Supplemental Fig 3).

The Tumor Mutational Burden (TMB) is frequently proposed as a molecular characteristic indicative of efficacy to immunotherapy. Tumors with a high TMB exhibit more neoantigens and have been shown to exhibit increased sensitivity to anti-PD(L)1 therapies [148]. Epithelial LUAD, defined by AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> co-expression, had a higher TMB (median of 7.9 mut/Mb) than AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> specimens (median of 5.61 mut/Mb,  $p = 0.040$ ) and then AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors (median of 5.26 Mut/Mb,  $p = 0.006$ ) (Fig 5A).

Two additional parameters of significance related to immunotherapy response include intratumoral inflammation and sustained activation of the IFN $\gamma$  pathway. Alteration of the inflammation score was thus observed in mesenchymal tumors compared to hybrid ( $p < 0.0001$ ) and epithelial LUAD ( $p < 0.0001$ ) (Fig 5B). Moreover, chronic IFN $\gamma$  activation as a basal state exhibited significant differences based on the EMT status. AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> co-expression had a lower IFN $\gamma$  chronic activation score than AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD ( $p < 0.001$ ) and than AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors ( $p < 0.0001$ ) (see Fig 5C).

Unlike LUAD, TMB did not differ according to the co-expression of AXL or VIM in the LUSC cohort (Fig 5D). The inflammation score was also altered in mesenchymal LUSC compared to hybrid ( $p < 0.0001$ ) and epithelial LUSC ( $p < 0.0001$ ) (Fig 5E). As observed for LUAD, IFN $\gamma$  chronic activation as a basal state also significantly varied within EMT phenotypes, with AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> expressing lower level than AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> LUSC tumors ( $p < 0.0001$ ) and then AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> LUSC tumors ( $p < 0.0001$ ) (Fig 5F).

### ***AXL and VIM Co-expression Predicts Lower Response to Immunotherapy***

Considering the association of immune and inflammation characteristics with EMT traits, we assessed potential immune activity based on AXL and VIM co-expression.

Remarkably, the Innate Anti-PD-1 Resistance (IPRES) score was significantly higher for AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ) compared to AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ) and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ), indicating a higher probability of resistance to anti-PD-1 therapy in mesenchymal conditions (Fig 6A).

Another independent score, the Tumor Immune Dysfunction and Exclusion, also predicted a higher probability of immune resistance for AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ) compared to AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ) and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD ( $p < 0.0001$ ) (Fig 6B).

The TIDE score, which allows the classification of tumors into responders and non-responders to immunotherapy, showed that the proportion of responders increased from 12.6% to 36.3% for AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUAD, respectively ( $p < 0.0001$ ) (Fig 6C-D). This indicates a significant association between AXL / VIM co-expression and response to immunotherapy. The prediction of efficacy to immunotherapy by AXL/VIM co-expression was

robust, with an AUC of 0.724 (Fig 6E). When considering AXL, PD-L1, or VIM expression alone, their respective predictive values for immune response were lower (Supplemental Fig 4). Multivariate analysis also confirmed the independence of the VIM<sup>high</sup>/AXL<sup>high</sup> status in predicting immunotherapy response compared to PD-L1 expression, independently of the histological sub-type (Supplemental Fig 5).

Based on the pathways analyzed by TIDE, it was obvious that EMT, assessed by AXL/VIM expression, was strongly correlated with the Cancer-Associated Fibroblast (CAF) signature ( $r=0.571$ ,  $p < 0.0001$ ) and T cell dysfunction ( $r=0.507$ ,  $p < 0.001$ ), while immune cell exclusion was not significantly impaired, and the Tumor-Associated Macrophages M2 (TAM-M2) signature was negatively correlated ( $r=-0.224$ ,  $p < 0.001$ ). (Supplemental Table 10).

Similar results were observed for LUSC, with a higher probability of immune resistance for AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> LUSC ( $p < 0.0001$ ) compared to AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>high</sup> or AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>low</sup> LUSC ( $p < 0.0001$ ) and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUSC ( $p < 0.0001$ ) according to both IPRES and TIDE scores (Fig 6F-G). The proportions of responders to immunotherapy for LUSC increased from 6.8% to 44.7% for AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> and AXL<sup>low</sup>/VIM<sup>low</sup> LUSC, respectively ( $p < 0.0001$ ), with a reliable prediction of response based on VIM and AXL co-expression (AUC=0.677) (Fig 6 H-J). As observed for LUAD, AXL expression strongly correlated with T cell dysfunction ( $r=0.545$ ,  $p < 0.0001$ ), CAF infiltration ( $r=0.627$ ,  $p < 0.0001$ ), while immune cell exclusion was only minimally impaired ( $r=0.186$ ,  $p < 0.05$ ), and TAM-M2 was negatively correlated in LUSC cohort ( $r=-0.209$ ,  $p < 0.001$ ) (Supplemental Table 10).

## Discussion

In this study, we explored the interrelation between TEM and the immune features of NSCLC. We notably observed distinct cytokine and chemokine profiles depending on the mesenchymal or epithelial phenotypes of tumors, both in LUAD and LUSC, while establishing an EMT score applicable to both types of NSCLC. We also observed significant and positive correlations between EMT and PD-L1 (i.e., CD274), as well as other immune co-inhibitors, suggesting immune evasion in most mesenchymal tumors.

In order to simplify and make our concept applicable, the characterization of EMT has been reduced to 2 markers of interest, AXL and VIM, with VIM being a canonical and established marker of mesenchymal tumors and AXL also associated as a marker of a mesenchymal phenotype but presenting the dual advantage of being a potential therapeutic target.

Our investigation thus confirmed a strong correlation between high AXL and VIM expressions and mesenchymal features, as indicated by the expression of genes associated with EMT. This observation was consistent across NSCLC cell lines, LUAD, and LUSC cohorts, in line with previous reports in EGFR mutant NSCLC [149] and many other solid cancers [115,150]. Importantly, AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> specimens consistently exhibited a higher EMT score, indicating their mesenchymal nature and allowing for the simplification of EMT characterization to the expression of these two genes, thereby enhancing its clinical applicability for routine extrapolation [151].

Further deciphering immune-related traits associated with EMT in lung tumors, we found that mesenchymal tumors overall displayed lower anti-tumor-related characteristics, suggesting a higher immuno-resistance. This was reflected by elevated mRNA levels of multiple immune checkpoint inhibitors in mesenchymal AXL high/VIM high tumors, including PD-L2, TNFRSF8, LAG3, CTLA4, and TIGIT. The tumor mutational burden (TMB), which is commonly accepted as a marker for response to immunotherapy when increased, whether analyzed in tissue or blood [152], also varied based on the EMT: mesenchymal tumors had a lower TMB than epithelial tumors, suggesting immune resistance for mesenchymal tumors [148]. Additionally, inflammation and IFN $\gamma$  chronic activation were more impacted in mesenchymal tumors, as previously reported [153], further suggesting that EMT may drive an immunosuppressive microenvironment.

In line with our observations, others have also reported an intricate relationship between EMT and the immune system. For example, anti-PD-1 drugs showed efficacy in metastatic urothelial cancer with CD8<sup>+</sup> T-effector cell presence and high TMB, while resistance correlated with TGF $\beta$  signaling in fibroblasts, suggesting that TGF $\beta$  limits anti-tumor immunity by hindering T-cell infiltration in mesenchymal tumors [106,154]. Similar observations are published in metastatic melanoma [140].

A differential expression of chemokines and cytokines between mesenchymal and epithelial tumors has also highlighted distinct immune profiles associated with EMT in NSCLC, notably with a T-cell infiltration reduction in mesenchymal tumors [146,155]. Considering these data with our observation underscores the complexity of the tumor microenvironment, and supports the ability of mesenchymal tumors to create an immuno-suppressive microenvironment and a specific niche hindering the effectiveness of immunotherapies [146,155]. Although a significant limitation of our study is the absence of clinical data from patients who have undergone immunotherapy, we observed elevated scores for Innate Anti-PD-1 Resistance (IPRES) and Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) in AXL<sup>high</sup>/VIM<sup>high</sup> tumors. This suggests that the co-expression of AXL and VIM is associated with immune evasion mechanisms. Immunotherapies, such as anti-PD-(L)1 therapies, have indeed revolutionized cancer treatment, but response rates vary widely, and reliable predictive markers of efficiency that could easily be implemented in clinical practice are lacking. Our study indicates that AXL and VIM co-expression may be a strong predictor of resistance to immunotherapy.

## **Conclusion**

In conclusion, our study provides compelling evidence that AXL and VIM co-expression in NSCLC adequately identifies mesenchymal lung tumors and predicts lower response to immunotherapy. These findings enhance our understanding of the complex interplay between EMT and immunotherapy response in NSCLC. By tailoring immunotherapies to individual patients based on their AXL and VIM profiles, we anticipate improved clinical outcomes and a more personalized approach to NSCLC treatment. Tumors expressing AXL and VIM might skip perioperative immunotherapy in favor of direct surgical resection. Additionally, targeting AXL with developing drugs could involve a combination with anti-PD(L)1 to restore immune sensitivity. However, further prospective clinical studies are needed to validate and refine this approach before its widespread clinical implementation.

## Figure legends

### Figure 1. Development and validation of an EMT signature in NSCLC.

**A.** Heatmap illustrating the classification of 120 NSCLC cell lines into two distinct clusters (mesenchymal and epithelial), based on the differential expression of 74 genes linked to the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Each row represents a specific gene, while each column represents an individual cell line. The color gradient reflects the relative gene expression levels, with red indicating upregulation and blue indicating downregulation. **B.** Volcano plot illustrating 62 EMT-related genes with significant dysregulation between mesenchymal and epithelial NSCLC cell lines ( $n = 120$ ). Red-highlighted genes indicate significance, showcasing their altered expression in either phenotype. Positioned to the right of the x-axis (representing gene expression fold change on a  $\log_2$  scale), the mesenchymal group displays distinctive molecular patterns, while the y-axis denotes statistical significance ( $-\log_{10}$  adjusted p-value). **C.** Scattergram representing EMT scores associated with epithelial or mesenchymal status, previously defined by heatmap clustering in 120 NSCLC cell lines. Each data point represents a cell line positioned according to its EMT score and status determined by clustering. Horizontal bars represent the median. **D** and **F.** Scatterplots of the EMT scores were calculated for the 503 cases of LUAD samples (**D**) and the 502 samples of LUSC (**F**). Each point represents one LUAD or one LUSC sample. Mesenchymal or epithelial statuses are defined based on unsupervised clustering into respective cohorts as described in Fig 1A. **E** and **G.** ROC curves visually demonstrate the effectiveness of the EMT score in distinguishing between mesenchymal and epithelial subtypes of LUAD (**E**) or LUSC (**G**). The area under the curve (AUC) is calculated at respectively 0.826 and 0.796, indicating a high discriminatory capacity.

### Figure 2. Mesenchymal Tumors Harbor a Specific Immune Profile.

**A, C, E, G.** Chemokine (**A, E**) and cytokine (**C, G**) differentially expressed genes (DEG) in mesenchymal-like tumors versus epithelial-like tumors within the LUAD (**A,C**) or the LUSC (**E, G**) TCGA cohorts. Genes highlighted in red are significantly differentially expressed between mesenchymal and epithelial tumors. On the right of the x-axis are genes overexpressed in mesenchymal tumors whereas those on the left of the axis are found at higher levels in epithelial tumors. The y-axis denotes statistical significance ( $-\log_{10}$  adjusted p-value). DEGs were analyzed by REACTOME, available at: <https://reactome.org/>. **B, D, F, H.** Voronoi representation of the Functional signaling enrichment analysis based on chemokine (**B, F**) or cytokine (**D, H**) DEG within the LUAD (**B, D**) or LUSC (**F, H**)-TCGA cohorts. A statistical assessment using the hypergeometric distribution was employed to ascertain whether particular Reactome pathways exhibited over-representation (enrichment) within the provided datasets. The compartments depicted in yellow are statistically significantly over-represented ( $p < 0.05$ ), with the color intensity proportional to the level of significance, as indicated by the scale provided on the right side of the image.

**Figure 3. EMT positively correlates with many immune checkpoint inhibitors.**

**A and B.** Correlation matrix summarizing the relationships between EMT score and immune checkpoint inhibitors of interest within the LUAD (A) and LUSC (B) TCGA cohorts. The degree of correlation is proportional to the intensity, as indicated in the scale on the right side of the figure. Positive correlations are depicted in green cells, while negative correlations are shown in red.

**Figure 4. The co-expression of AXL and VIM is a significant marker to differentiate mesenchymal from epithelial NSCLC tumors.**

**A, B/F, G.** Scatterplot depicting the mRNA expression levels of vimentin (VIM) (A) or AXL (B) in epithelial versus mesenchymal tumors previously categorized through the unsupervised classification (as described in Fig 1A.) in the 503 cases of LUAD (A,B) or the 502 cases of LUSC (F, G). Each data point on the plot represents a tumor sample. **C, H.** Scatterplot illustrating the EMT score levels derived from the co-expression of vimentin (VIM) and AXL in the 503 LUAD (C) and the 502 LUSC (H) cases. AXL and VIM statuses were determined based on their respective median mRNA expressions. Each data point represents a tumor sample. **D, I.** Linear regression analyses demonstrate a significant correlation between AXL and VIM expression in the LUAD cohort (D:  $r=0.689$ ,  $R^2=0.474$ ,  $p < 0.0001$ ) and the LUSC cohort (I:  $r=0.727$ ,  $R^2=0.527$ ,  $p < 0.0001$ ). The regression line is bounded by the 95% confidence interval, represented by dashed lines. The VIM and AXL expression levels are in Log<sub>2</sub> scale on the x and y axes respectively. **E, J.** The ROC curve analyses of the effectiveness of VIM and AXL co-expression to distinguish mesenchymal and epithelial subtypes within LUAD (E) and LUSC (J) cohorts. The EMT status was determined using the unsupervised classification (as described in Fig 1A). Achieving respectively an AUC of 0.704 and 0.739 indicates a high discriminatory capability.

**Figure 5. Mesenchymal tumors display immune traits associated with immunotherapy resistance in LUAD and LUSC cohorts.**

**A, D.** Scattergrams displaying the Tumor Mutational Burden (TMB) based on the level of co-expression of AXL and VIM in the LUAD (A) or the LUSC (D) cohort. TMB is expressed as mutations per megabase (mut/Mb). **B, E.** Scattergrams illustrating the level of intratumoral basal inflammation (inflammation score) based on the AXL and VIM statuses in the LUAD (B) or the LUSC (E) cohort. **C, F.** Scattergrams depicting the basal level of chronic IFN $\gamma$  activation based on the AXL and VIM statuses in the LUAD (C) or the LUSC (F) cohort. AXL and VIM statuses are defined based on their respective median mRNA expressions as previously described.

**Figure 6. Tumors co-expressing AXL and VIM demonstrate immune characteristics linked to diminished responsiveness to immunotherapy in LUAD and LUSC.**

**A, F.** Scattergrams depicting the Innate anti-PD-1 Resistance score (IPRES) based on the co-expression levels of AXL and VIM in the LUAD (A) and LUSC (F) cohort. AXL and VIM statuses are defined based on their respective median mRNA expressions as previously described in Fig 4C. **B, G.** Scattergrams illustrating the Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) score based on the co-expression levels of AXL and VIM in the LUAD (B) or LUSC (G) cohort. **C, H.** Waterfall plots illustrating immune responses based on TIDE prediction scores across LUAD (C) or LUSC (H) tumors and categorized by their expression levels for AXL and VIM. The blue and orange bars represent non-responder and responder cases, respectively. Tumors are grouped from left to right according to the expression of AXL and VIM as indicated on the x-axis; the y-axis represents the TIDE score value. **D, I.** Histograms depicting the variation of responders vs. non-responders to immunotherapy based on TIDE prediction scores across LUAD (D) or LUSC (I) tumors and categorized by their expression levels for AXL and VIM. The blue and orange bars represent non-responder and responder cases, respectively. **E, J.** ROC curve analyses of the effectiveness of AXL and VIM co-expression to predict the response to immunotherapy in the context of LUAD (E) or LUSC (J).

**Supplemental Figure 1. Performance of 62-EMT-related genes to identify mesenchymal from epithelial NSCLC cell lines.**

**A.** Heatmap demonstrating the categorization of 120 NSCLC cell lines into two separate clusters, namely mesenchymal and epithelial. This classification is based on the varying expression levels of 62 pre-determined genes associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Each row represents a specific gene, while each column represents an individual sample. The color gradient reflects the relative gene expression levels, with red indicating upregulation and blue indicating downregulation. **B.** The ROC curve visually demonstrates the effectiveness of the EMT score in distinguishing between mesenchymal and epithelial subtypes of NSCLC. The area under the curve (AUC) is calculated at 0.993, indicating a strong discriminatory capacity. The EMT score computation is performed using the previously defined set of 62 genes, contributing to this predictive ability. EMT status was based on unsupervised clustering from the heatmap in Supplemental Fig 1A.

**Supplemental Figure 2. Differential expression genes between mesenchymal and epithelial tumors in LUAD and LUSC cohorts.**

Volcano plot illustrating 78 EMT-related genes with significant dysregulation between mesenchymal and epithelial LUAD (A) or LUSC (B) tumors. Red-highlighted genes indicate significance, showcasing their altered expression in either phenotype. Positioned to the right of the x-axis (representing gene expression fold change on a log<sub>2</sub> scale), the mesenchymal group displays distinctive molecular patterns, while the y-axis denotes statistical significance (-log<sub>10</sub> adjusted p-value).

**Supplemental Figure 3. CD274 (i.e. PD-L1) co-expression with AXL or AXL + VIM across NSCLC-TCGA Cohorts.**

CD274 (i.e., PD-L1) correlates with AXL in the LUAD (A) ( $r=0.470$ ,  $R^2=0.219$ ,  $p < 0.0001$ ) and the LUSC (B) ( $r=0.091$ ,  $R^2=0.006$ ,  $p < 0.05$ ) cohort. CD274 (i.e., PD-L1) correlates with AXL + VIM score in the LUAD (C) ( $r=0.482$ ,  $R^2=0.231$ ,  $p < 0.0001$ ) and the LUSC (D) ( $r=0.151$ ,  $R^2=0.021$ ,  $p < 0.001$ ) cohort. Data are presented in dot plots with a log<sub>2</sub> scale and analyzed using the Spearman regression test. The regression line is bounded by the 95% confidence interval, represented by dashed lines.

**Supplemental Fig 4. Prediction of Response to Immunotherapy Based on TIDE Score for VIM, AXL, or PD-L1 in LUAD and LUSC cohorts.**

Waterfall plots of the immune response based on the TIDE prediction score across all LUAD (A-C) and LUSC (D-F) tumors, considering the expression of each biomarker individually (i.e. VIM or AXL or PD-L1).

**Supplemental Fig 5. Multivariate Analysis of Immunotherapy Response Prediction in LUAD and LUSC cohorts.**

Forest plots and corresponding numerical values with confidence intervals for various markers of interest (PD-L1, AXL, VIM) among LUAD (A-B) and LUSC (C-D) tumors demonstrating strong and independent ability to predict immune sensibility for AXL and VIM co-markers.

**Declarations**

**Ethics approval and consent to participate**

Not Applicable

**Consent for publication**

Not Applicable

**Availability of data and material**

The results here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Competing interests**

No conflict of interest

## **Funding**

With financial support from ITMO Cancer of Aviesan within the framework of the 2021-2030 Cancer Control Strategy, on funds administered by Inserm, URCA.

## **Authors' contributions**

JA: conceptualization, software, methodology, formal analysis, visualization, writing original draft, writing–review, editing and he is the guarantor of this study. BNR: writing original draft, visualization, writing–review and editing. VDa: writing–review, visualization and editing. VDo: writing–review, visualization and editing. AD: writing–review, visualization and editing. GD: writing–review, visualization and editing. CG: conceptualization, visualization, writing original draft, writing–review, editing. MP: conceptualization, methodology, resources, supervision, funding acquisition, project administration, writing original draft, writing–review, editing.

## **Acknowledgments**

The research effort associated with this article was funded in part by the “Partenariat Hubert Curien-Tournesol”.

## **List of abbreviations**

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

LUAD : Lung Adenocarcinoma

LUSC : Lung Squamous Cell Carcinoma

TMB : Tumor Mutational Burden

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

TCGA : The Cancer Genome Atlas

DEG : Differentially Expressed Genes

IPRES : Innate Anti-PD-1 Resistance Signature

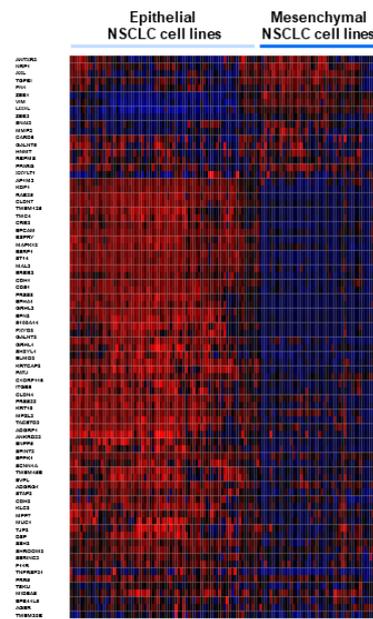
TIDE : Tumor Immune Dysfunction and Exclusion

ROC : Receiver Operating Characteristic

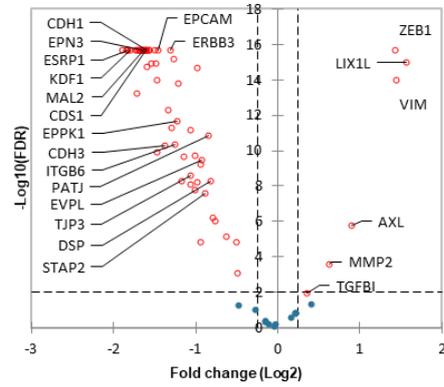
AUC : Area Under the Curve

# Figures

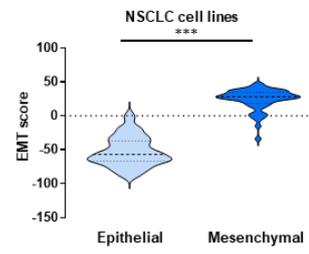
**A**



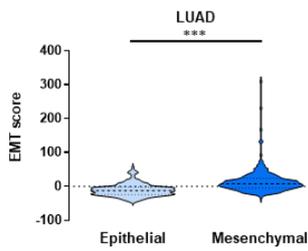
**B**



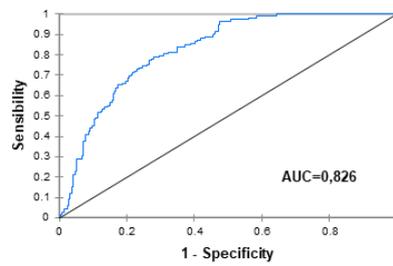
**C**



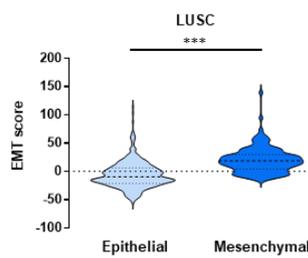
**D**



**E**



**F**



**G**

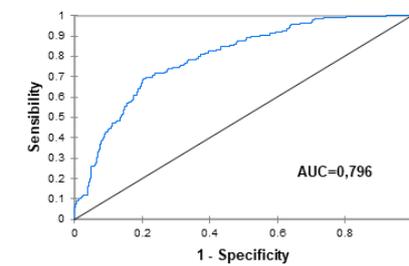
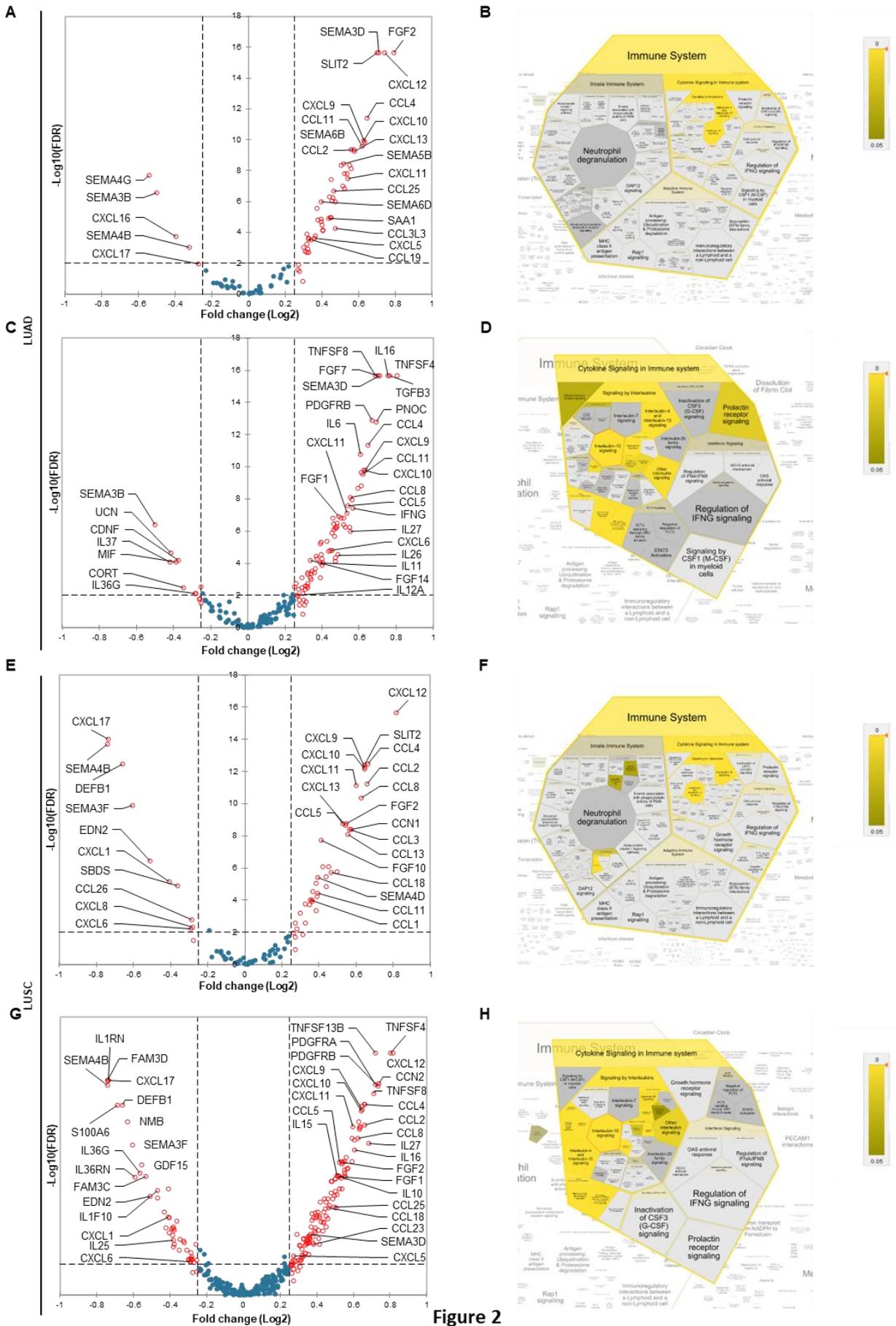


Figure 1



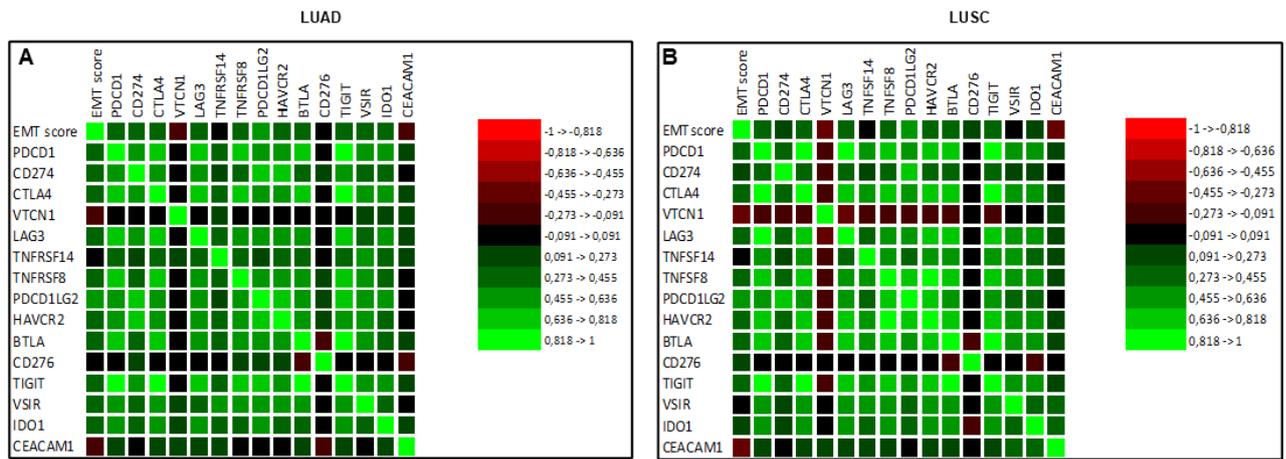


Figure 3

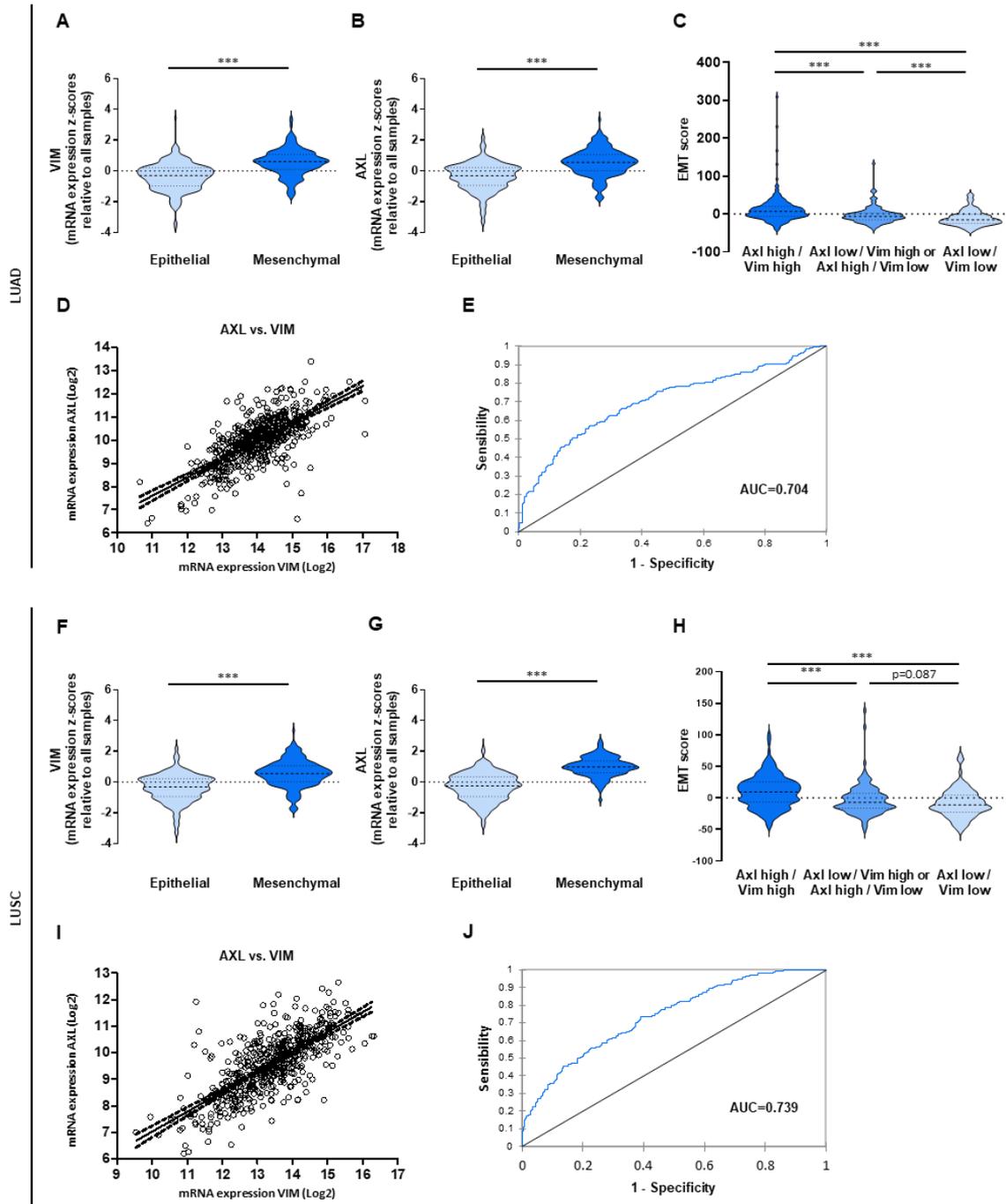


Figure 4

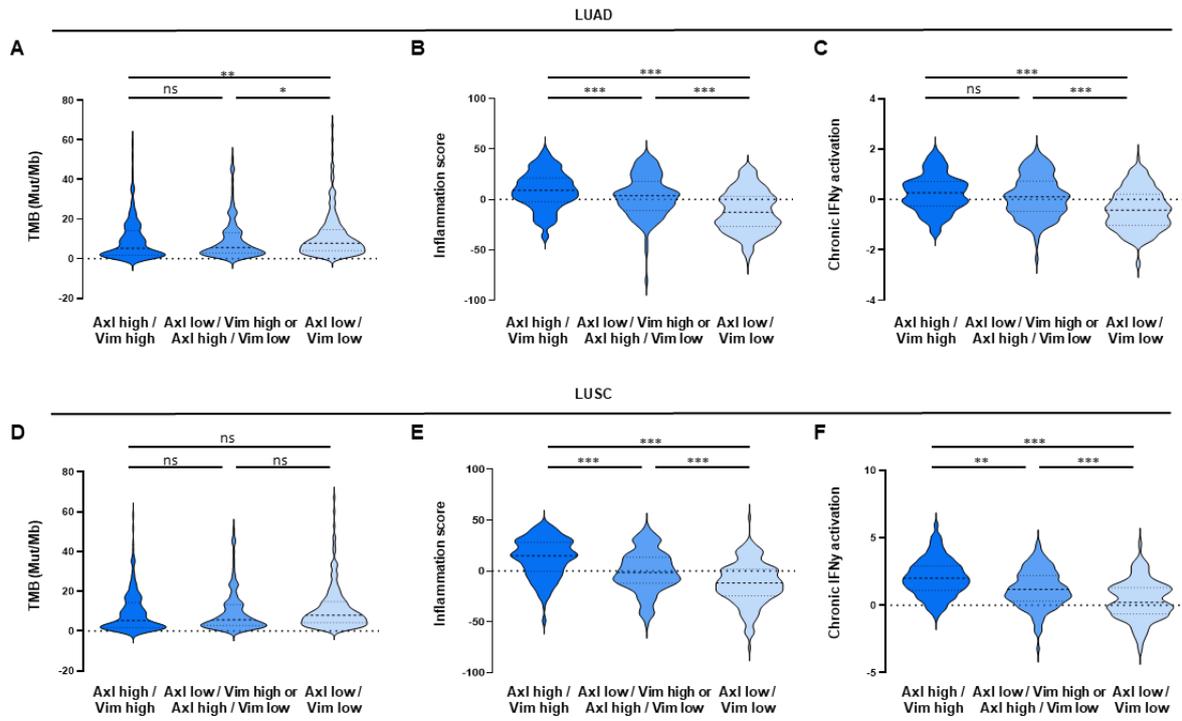


Figure 5

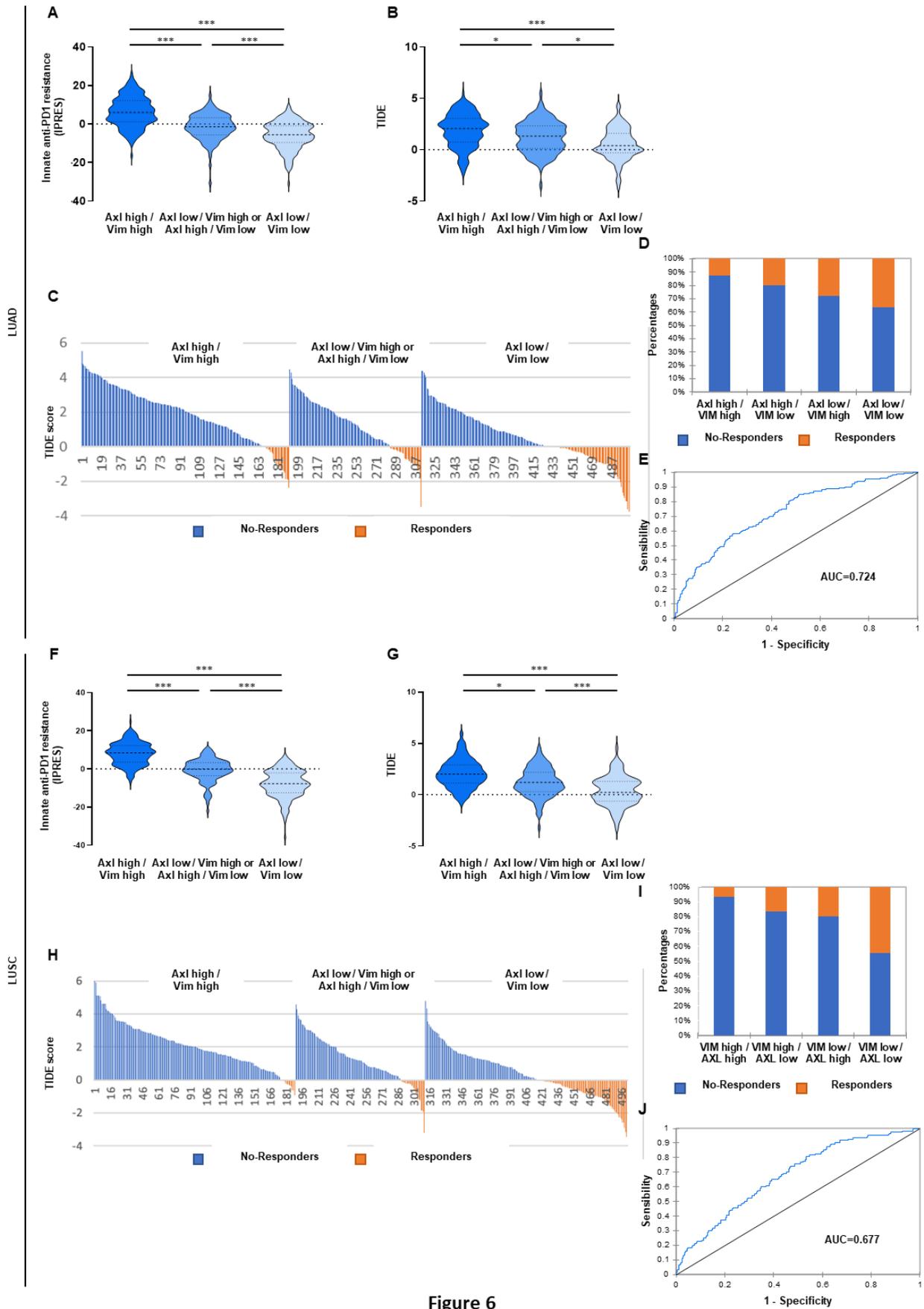
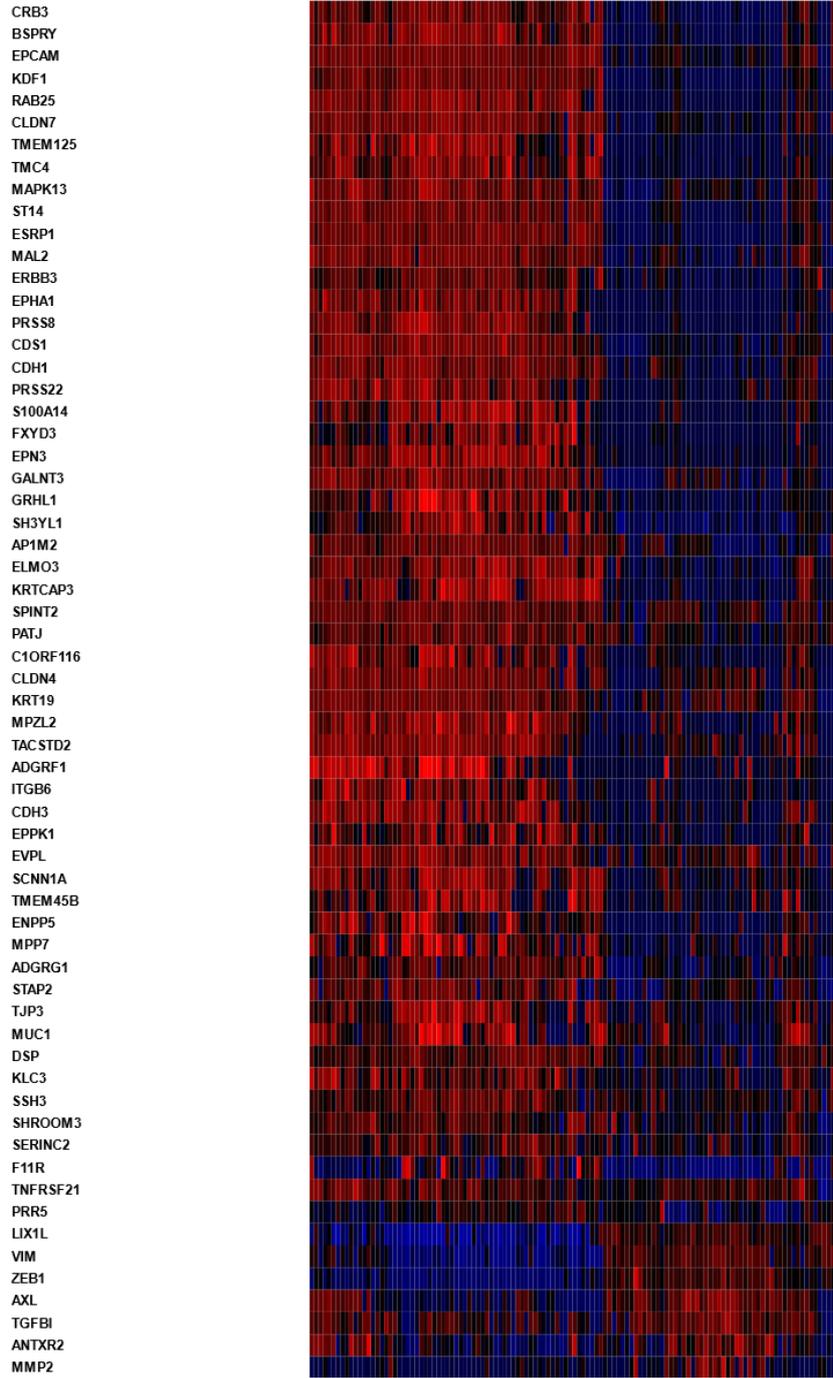
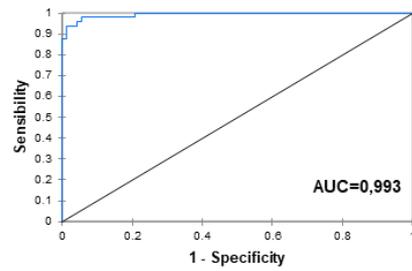


Figure 6

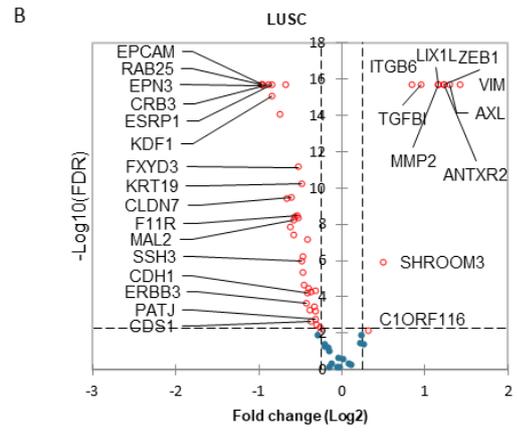
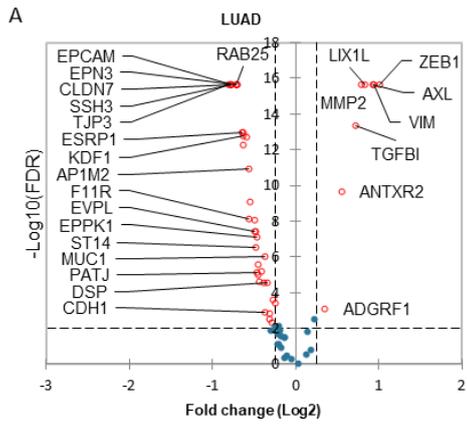
A



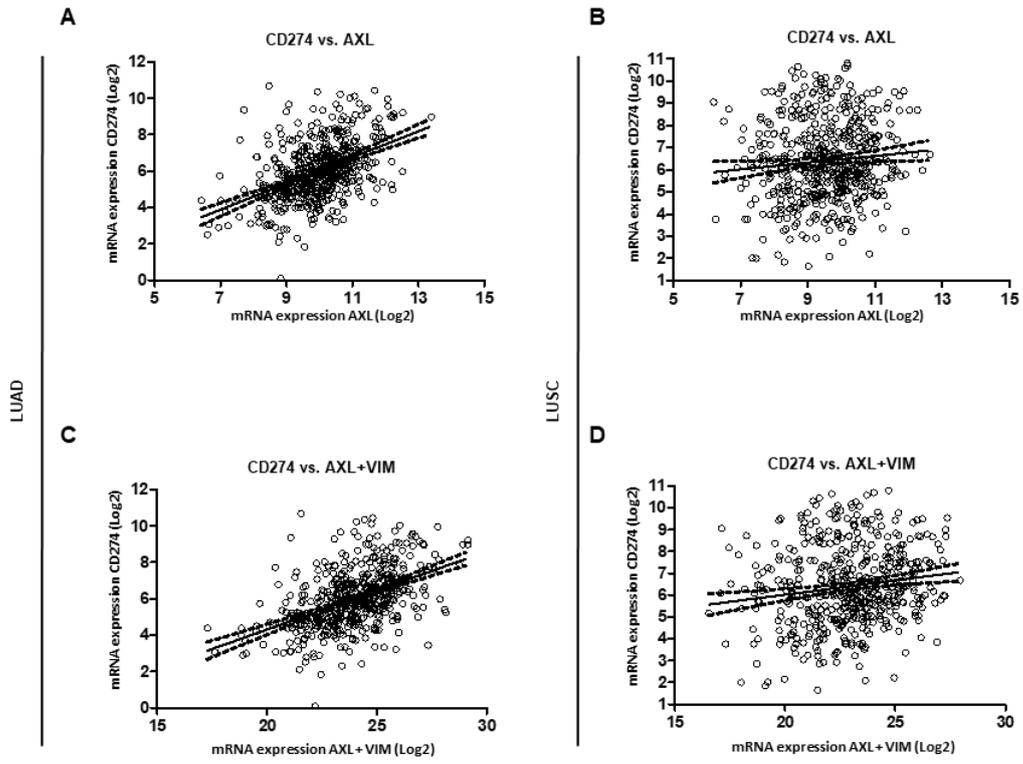
B



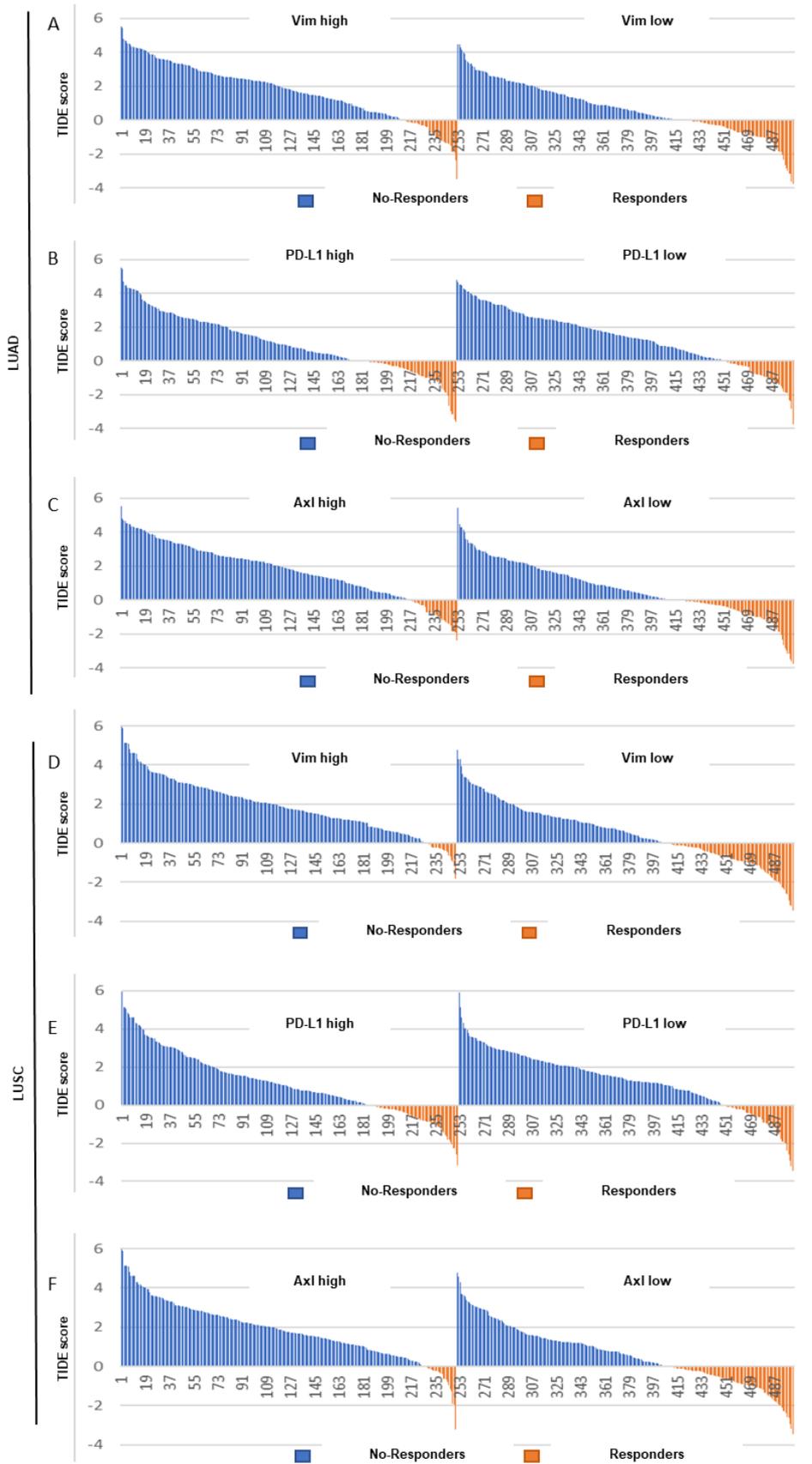
Supp Figure 1



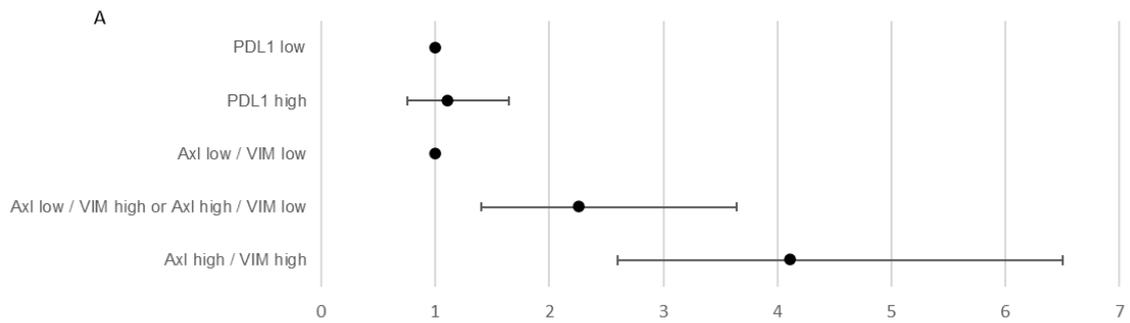
**Supp Figure 2**



Supp Figure 3

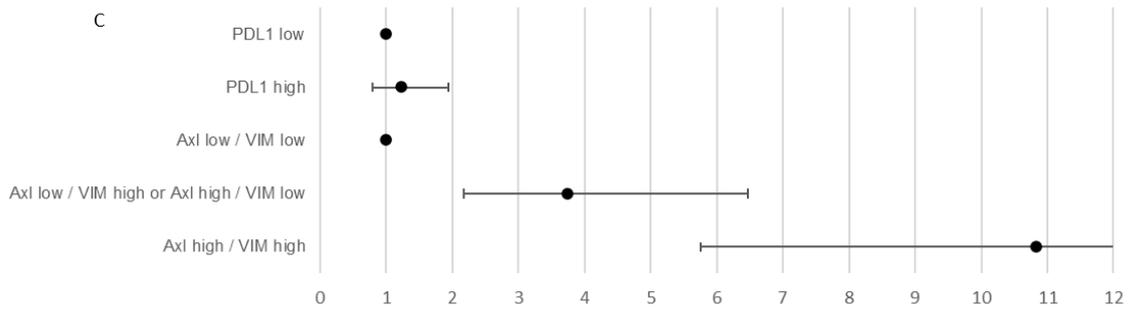


Supp Figure 4



**B**

Variable	Odds ratio	Odds ratio Lower limit (95%)	Odds ratio Upper Limit (95%)	p-value
AXL and VIM co-expression-Axl low / VIM low	reference			
AXL and VIM co-expression-Axl low / VIM high or Axl high / VIM low	2,258	1,402	3,638	<b>0,001</b>
AXL and VIM co-expression-Axl high / VIM high	4,114	2,603	6,501	<b>&lt;0,0001</b>
PDL1 status-PDL1 low	reference			
PDL1 status-PDL1 high	1,112	0,752	1,646	0,595



**D**

Variable	Odds ratio	Odds ratio Lower limit (95%)	Odds ratio Upper Limit (95%)	p-value
AXL and VIM co-expression-Axl low / VIM low	reference			
AXL and VIM co-expression-Axl low / VIM high or Axl high / VIM low	3,752	2,174	6,474	<b>&lt;0,0001</b>
AXL and VIM co-expression-Axl high / VIM high	10,829	5,754	20,381	<b>&lt;0,0001</b>
PDL1 status-PDL1 low	reference			
PDL1 status-PDL1 high	1,233	0,786	1,934	0,362

**Supp Figure 5**

## **II. AXL comme biomarqueur prédictif de la résistance à l'immunothérapie dans le cancer bronchique non à petites cellules métastatique**

### **1. Résumé**

Le cancer du poumon reste un enjeu majeur de santé publique. Durant la dernière décennie, l'approche thérapeutique du CBNPC avancé et métastatique a connu des transformations majeures avec l'avènement de l'immunothérapie (IO). Ces traitements, basés sur des anticorps monoclonaux, visent les points de contrôle immunitaires tels que PD-1/PD-L1, permettant au système immunitaire du patient de cibler les cellules tumorales et de générer potentiellement des réponses cliniques durables [43].

Les résultats positifs ont permis de faire de l'IO le traitement de référence pour le CBNPC, en fonction des niveaux d'expression de PD-L1. Quel que soit le niveau de PD-L1, l'association de l'IO à la chimiothérapie (CT) est désormais envisageable, ce qui entraîne une augmentation médiane de la survie sans progression (SSP) d'environ 3 mois, ainsi qu'un doublement de la survie globale médiane, comme le démontrent les études KEYNOTE 407 [31] et KEYNOTE 189 [32]. Il est également possible de proposer l'IO seule à une population sélectionnée de patients présentant une forte expression de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ), sur la base des données des études [27,28], IMPower 110 [29] et EMPOWER-Lung 1 [30] pour le Pembrolizumab, l'Atezolizumab et le Cemiplimab, respectivement.

Malgré l'impact significatif de l'IO sur la prise en charge du CBNPC, l'identification des patients qui en bénéficieront le plus reste un défi clinique [156]. À ce jour, l'expression de PD-L1, mesurée par immunohistochimie, constitue le biomarqueur le plus couramment employé pour anticiper la réponse à l'IO et reste le seul intégré dans la pratique clinique. Cependant, ses capacités prédictives limitées mettent en évidence le besoin de développer des biomarqueurs prédictifs alternatifs [157–159].

AXL est un récepteur tyrosine kinase appartenant à la famille des TAM (TYRO3-AXL-MERTK). Une dérégulation de l'expression d'AXL a été observée dans divers cancers d'origines histologiques variées, notamment le mélanome, les cancers gastro-intestinaux, les néoplasmes de la tête et du cou, ainsi que le cancer du sein. L'expression d'AXL a également été rapportée dans les tumeurs thoraciques telles que le mésothéliome et le CBNPC. Des niveaux élevés d'AXL ont été associés à un mauvais pronostic dans plusieurs tumeurs solides, y compris le CBNPC. AXL facilite également la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [97]. La signalisation intracellulaire d'AXL régule positivement des facteurs de transcription essentiels à la TEM, tels que TWIST, ZEB1, ZEB2 et SLUG. Il favorise l'expression de la N-cadhérine tout en réduisant celle de l'E-cadhérine, induisant ainsi la TEM, comme cela a été observé dans le CBNPC [99]. Comme précédemment rapporté, la TEM est largement reconnue comme un mécanisme de résistance à diverses thérapies [160]. AXL régule les cascades de signalisation cellulaire et la communication au sein du microenvironnement tumoral, impliquant les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires [89]. L'ensemble de ces

données soutiennent AXL en tant que cible moléculaire prometteuse pour traiter la résistance aux thérapies anti-PD-1 et l'immunosuppression [161].

Compte tenu de son impact biologique, nous avons exploré les implications cliniques de l'expression tumorale d'AXL sur les résultats de patients atteints de CBNPC avancé, traités par thérapies anti-PD-1, en les comparant à un groupe contrôle traité par CT.

Cette étude rétrospective monocentrique a inclus 89 patients consécutifs diagnostiqués avec un CBNPC métastatique, traités en première ligne par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire et/ou chimiothérapie entre septembre 2015 et mars 2023 au CHU de Reims, en France. Les caractéristiques cliniques à l'inclusion ont été collectées, et une analyse de survie, incluant la survie sans progression (SSP) et la survie globale (SG), a été réalisée. L'expression d'AXL dans les cellules tumorales a été évaluée par immunohistochimie et un score de propension a été utilisé pour tenir compte des facteurs pronostiques.

La médiane de SSP était plus courte pour les patients ayant des tumeurs AXL-positives par rapport à ceux ayant des tumeurs AXL-négatives (4,3 mois contre 5,3 mois,  $p = 0,044$ ). Comme attendu, le groupe immunothérapie (IO) montrait une amélioration de la SSP par rapport au groupe contrôle chimiothérapie (7,6 mois contre 4,4 mois,  $p = 0,006$ ), avec des taux de réponse objective plus élevés (48 % contre 22 %) et des taux de contrôle de la maladie supérieurs (64 % contre 57 %). L'analyse en sous-groupe, la positivité pour AXL était associée à un bénéfice réduit de l'IO, les patients IO-AXL-négatifs présentant une meilleure SSP ( $p = 0,003$ ) et une meilleure SG ( $p = 0,018$ ) par rapport aux patients IO-AXL-positifs. L'analyse multivariée a confirmé l'expression d'AXL comme facteur significatif de moins bonne SSP (HR 4,15, IC 95 % 1,35-12,82,  $p = 0,013$ ) et SG (HR : 5,634, IC 95 % 1,75-18,15,  $p = 0,004$ ). L'analyse génomique a révélé que les mutations KRAS et STK11 étaient plus fréquentes dans les tumeurs AXL-positives, suggérant un lien potentiel entre l'expression d'AXL et certaines altérations génomiques spécifiques.

L'expression tumorale d'AXL a un impact significatif dans le CBNPC métastatique sur les résultats des traitements, avec un bénéfice réduit spécifiquement en cas de traitement par immunothérapie. AXL pourrait servir de biomarqueur pertinent pour identifier les patients susceptibles de bénéficier de la combinaison immunothérapie-chimiothérapie, ainsi que d'une cible thérapeutique potentielle pour prévenir ou surmonter la résistance aux immunothérapies. Des études supplémentaires seront nécessaires pour valider ces résultats et optimiser la sélection des patients et les stratégies de traitement.

## 2. Article scientifique

*Thèse sur article :*

**AXL expression to predict resistance to immunotherapy in metastatic non-small cell lung cancer**

*In submission*

### **Authors**

**Julien Ancel<sup>1,2,#</sup>, Maxime Dewolf<sup>2</sup>, Béatrice Nawrocki-Raby<sup>1</sup>, Anne Durlach<sup>1,3</sup>, Véronique Dalstein<sup>1,3</sup>, Nathalie Lalun<sup>1</sup>, Valérian Dormoy<sup>1</sup>, Gaëtan Deslée<sup>1,2</sup>, Christine Gilles<sup>4,\*</sup> and Myriam Polette<sup>1,3,\*</sup>**

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM, P3Cell, UMR-S 1250, Reims, France

<sup>2</sup> CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Service de Pneumologie, Reims, France

<sup>3</sup> CHU Reims, Pôle de Biologie Territoriale, Service de Pathologie, Reims, France

<sup>4</sup> University of Liège, GIGA Cancer, Laboratory of Tumor and Development Biology, Liège, Belgium

\*contributed equally

**#Corresponding author:** Julien Ancel, INSERM UMR-S 1250, Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims, France. E-mail address: [jancel@chu-reims.fr](mailto:jancel@chu-reims.fr)

**Keywords: Non-small cell lung cancer, Immunotherapy, AXL, Biomarker, Resistance.**

## **Abstract**

### **Background.**

Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents a major global health challenge. Although immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 has improved treatment outcomes, predicting patient response remains difficult. AXL, a receptor tyrosine kinase associated with poor prognosis and therapy resistance, may offer a promising alternative biomarker. This study examines the impact of AXL expression on treatment outcomes in advanced NSCLC patients treated with anti-PD-1 therapies versus chemotherapy, exploring AXL's potential as a predictive marker.

### **Methods.**

This retrospective single-center study included 89 consecutive patients diagnosed with metastatic NSCLC, treated in first line with immune checkpoint inhibitors (ICI) and/or chemotherapy between September 2015 and March 2023 at the University Hospital of Reims, France. Baseline clinical characteristics were collected, and survival analysis, including progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were reviewed. AXL expression in tumor cells was assessed by immunohistochemistry and a propensity score matching was used to account for prognostic cofactors.

### **Results.**

Eighty-nine patients with advanced NSCLC were included. The median PFS was shorter for patients with AXL-positive tumors compared to those with AXL-negative tumors (4.3 months vs. 5.3 months,  $p = 0.044$ ). As expected, the immunotherapy (IO) group showed improved PFS compared to the chemotherapy (CT) control group (7.6 months vs. 4.4 months,  $p = 0.006$ ), with higher objective response rates (48% vs. 22%) and disease control rates (64% vs. 57%). Notably, AXL positivity was associated with reduced benefit from IO, with IO-AXL-negative patients experiencing better PFS ( $p = 0.003$ ) and OS ( $p = 0.018$ ) compared to IO-AXL-positive patients. Multivariate analysis confirmed AXL expression as a significant factor for poorer PFS (HR 4.15, 95% CI 1.35-12.82,  $p = 0.013$ ) and OS (HR 5.634, 95% CI 1.75-18.15,  $p = 0.004$ ). Genomic analysis revealed that KRAS and STK11 variants were more frequent in AXL-positive tumors, suggesting a potential link between AXL expression and specific genomic alterations.

### **Conclusions.**

Tumor AXL expression has a significant impact on treatment outcomes with reduced benefit from immunotherapy compared to chemotherapy alone in metastatic NSCLC. AXL expression may serve as a relevant biomarker for identifying patients who might benefit from combining immunotherapy with chemotherapy, and as a potential therapeutic target to prevent or overcome resistance to ICI. Further studies is required to validate these findings and optimize patient selection and treatment strategies.

## Introduction

Lung cancer continues to be a major global health issue, with its prevalence increasing and resulting in 2.2 million new cases in 2020 [162]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common histological type, accounting for 80% of cases. In the past decade, the treatment landscape for advanced and metastatic NSCLC has fundamentally changed with the introduction of immunotherapy (IO). These monoclonal antibodies target immune checkpoints such as PD-1/PD-L1, enabling the host immune system to generate a response against tumor cells, potentially leading to durable clinical responses [43].

Positive results have thus led to the registration of IO as the standard treatment for NSCLC based on PD-L1 expression levels. For any PD-L1 expression level, it is thus possible to combine IO with chemotherapy (CT), resulting in a median PFS increase of approximately 3 months and nearly doubling the median OS, in accordance with KEYNOTE 407 [31] and KEYNOTE 189 [32] trials. It is also possible to propose IO alone to a selected patient population with high PD-L1 expression ( $\geq 50\%$  of tumor proportion score (TPS)), based on data from KEYNOTE 024 [27,28], IMPower 110 [29] and EMPOWER-Lung 1 [30] for Pembrolizumab, Atezolizumab and Cemiplimab, respectively.

Despite the significant impact of IO on NSCLC management, identifying which patients will benefit the most remains a clinical challenge [156]. Currently, PD-L1 expression assessed through immunohistochemistry is the most widely used biomarker for predicting response to IO and remains the only marker integrated into clinical practice. However, incomplete predictive power and inter-assay variability, highlight the necessity for alternative predictive biomarkers [157–159].

AXL is a receptor tyrosine kinase belonging to the TYRO3-AXL-MERTK (TAM) receptor kinase family (1). Dysregulation of AXL expression has been observed in various cancers of diverse histological origins, including melanoma, gastrointestinal cancers, head and neck neoplasms, and breast cancers (2). AXL expression has also been reported in thoracic malignancies such as mesothelioma (3) and NSCLC. High levels of AXL have been associated with poor prognosis in several solid tumors, including NSCLC (2). AXL also facilitates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [97]. AXL intracellular signaling by AXL positively regulates transcription factors essential for EMT, including TWIST, ZEB1, ZEB2, and SLUG. It promotes N-cadherin expression while decreasing E-cadherin expression to induce EMT, as reported in NSCLC [99]. EMT is broadly reported as a mechanism of resistance to various therapies, including anti-PD-1 antibodies [160]. AXL regulates cell signaling cascades and communication within the tumor microenvironment, involving cancer cells, endothelial cells, and immune cells [89].

Altogether, cumulative evidence thus supports AXL as a promising molecular target to address therapy resistance and immunosuppression [161]. We here explored the clinical implications of tumor AXL expression on patient outcomes in advanced NSCLC patients treated with anti-PD-1 therapies.

## Methods

### *Patients' selection*

This retrospective single-center study, conducted at the University Hospital of Reims, France, included 89 patients diagnosed with metastatic NSCLC without actionable genetic alterations (AGAs) and treated with first-line IO (either as monotherapy or in combination with CT) between September 2015 and March 2023.

The inclusion criteria were as follows : 1) patients aged 18 years or older with metastatic NSCLC treated at the University Hospital of Reims, France, 2) first-line treatment with immunotherapy for the "IO group" (monotherapy or combined with CT) or first-line chemotherapy for the "CT group", and 3) availability of clinical data. The exclusion criteria included : 1) histology inconsistent with NSCLC, 2) NSCLC with AGAs in first-line treatment, 3) no remaining tumor tissue available for biomarker assessment, and 4) previous treatment for NSCLC in earlier stages (including radiation and/or systemic therapies).

Baseline clinical characteristics such as age, gender, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status, histology, TNM stage derived from pre-therapeutic PET/CT scans, and smoking status, along with PD-L1 Tumor Proportion Score (TPS), initiation date of the first treatment course, treatment line, specific immune checkpoint inhibitor (ICI) administered, initial follow-up date, and either the date of death or the most recent contact, were collected from the patient's medical records.

### *Survival analysis*

For each patient included in the study, comprehensive clinical and biological data were collected before the initiation of IO and/or CT. In accordance with established clinical guidelines, IO or CT was administrated until either disease progression or the emergence of adverse effects. PFS was calculated from the initiation of treatment to the point of disease progression, as determined by CT scan, or until death or the last follow-up. OS was determined from the initiation of treatment to either death or the last follow-up.

Treatment responses were evaluated using the RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) criteria, specifically version 1.1 as described by Eisenhauer in 2009 [163]. When CT-based evaluation not feasible per RECIST guidelines, or if the patient's condition deteriorated rapidly, response was assessed using clinical and laboratory methods. These cases were included in the OS analysis but excluded from the PFS according to RECIST criteria. The scans and medical records were reviewed by two experienced clinicians, blinded to the AXL expression values.

### *Immunohistochemistry analysis*

Sections of 3-micrometer were obtained from formalin-fixed paraffin-embedded blocks of NSCLC. After antigen retrieval in Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako, Glostrup, Denmark) and endogenous peroxidase inhibition in Bloxall Blocking Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), tissue sections were incubated with the primary anti-AXL rabbit polyclonal antibody (1 :250; cat. No. PA5-77875 ; Invitrogen) for 1h at room temperature.

Samples were subsequently washed with PBS and incubated with the ImmPress HRP anti-Rabbit IgG detection kit (Vector Laboratories). HRP activity was revealed with the ImmPACT NovaRED peroxidase substrate kit (Vector Laboratories), according to the manufacturer's protocol. Whole slide images were captured using an inverted slide scanner equipped with a Pike IEEE1394b camera and a 20X objective (VS120 ; Olympus Corporation, Tokyo, Japan). AXL expression was then evaluated by a qualified pathologist by a tumor proportion score (TPS), with the pathologist being blinded to clinical outcomes.

### *Statistical analysis*

The data were presented as medians and ranges for quantitative variables and as counts and percentages for qualitative variables. Associations between features were analyzed using the Fisher test. Quantitative data were evaluated using non-parametric tests, such as the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests, to determine significance across different conditions. Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method, with significance assessed through the log-rank test and Cox regression where appropriate.

Propensity score matching was conducted using 1 :1 matching without replacement (greedy-matching algorithm), with a caliper width equal to 0.1 of the standard deviation of the logit of the propensity score. The “timeROC” R package (<https://cran.r-project.org/web/packages/timeROC/index.html>) was used to compare the area under curves (AUCs) of ROC curves for predicting PFS and OS based on varying levels of AXL expression. Oncoprint visualization was performed using tools available at <https://docs.cbioportal.org/>. In all exploratory analyses, a two-sided p-value 0.05 was considered statistically significant. Data analysis and formatting were conducted using XLSTAT software (version 2023.3.1 (1416), Addinsoft, Paris, France) and R software (v 4.3.2).

### *Ethical consideration*

This retrospective observational study was approved by data protection departments of the University Hospital of Reims (MR004160420221). In accordance with French law, information notices for non-opposition were sent to patients who were alive at the time of data collection.

## **Results**

### *Patient's characteristics*

We first screened 160 patients with an advanced NSCLC and treated in the first line by IO with or without CT between September 2015 and March 2023. CONSORT diagram is available in Fig 1. Patients with AGAs (EGFR, n = 7 and ALK, n = 2), absence of remaining tumor tissue to assess AXL expression (n = 27) or pretreated by non-palliative radiation and/or CT in the past year (n = 35) were excluded. Finally, we enrolled 89 patients with advanced NSCLC to assess the efficacy of the biomarker AXL in predicting response to IO in the original cohort (before propensity score matching). The median age of the patients was 64 years, with a range of 42 to 83 years. Among them, 43 patients (48.3%) were 65 years or older. The median body

mass index (BMI) was 23.4 kg/m<sup>2</sup> (table 1). The cohort included 55 males and 34 females. In terms of smoking history, 61 patients (68.5%) were either never-smokers or former smokers, while 28 patients (31.5%) were current smokers. Regarding PD-L1 expression, 50 patients (56.2%) had a TPS < 50% expression, 32 patients (36%) had a TPS ≥ 50%, and the PD-L1 status was unknown for 7 patients (7.9%).

Histologically, most patients had adenocarcinoma (64 patients, 71.9%), followed by squamous cell carcinoma (22 patients, 24.7%), and other subtypes (3 patients, 3.4%). Most patients were at stage IV (84 patients, 94.4%), with a small number at stages IIIA/IIIB (5 patients, 5.6%).

Regarding treatment regimens, 52 patients (58.4%) received CT alone, 14 patients (15.7%) received IO alone, and 23 patients (25.8%) were treated with a combination of IO and CT. Performance status, as measured by the PS-ECOG scale, showed that 78 patients (87.6%) had a score of 0-1, while 11 patients (12.4%) had a score of 2. Metastatic sites included liver and Central Nervous System (CNS) metastasis in 7 patients (7.9%) and 22 patients (24.7%), respectively.

#### *Clinical outcomes for patients treated by chemotherapy and/or immunotherapy in the original cohort according to AXL expression*

In the original cohort, the superiority in terms of PFS was confirmed in favour of patients treated with IO +/- CT in comparison to patients treated by CT alone, with medians of 7.6 vs. 4.4 months ( $p = 0.006$ ) (Supplementary Fig 1A-B). Response rates also favoured the IO-treated group. In the CT group, 46% (24/51) of cases showed disease progression at the first assessment. The objective response rate according to RECIST criteria was 22% (11/49), and the disease control rate was 57% (28/49). For the IO group, RECIST-assessable response was observed in 32 patients. Disease progression occurred in 32% (10/31) cases at first assessment, while 2 patients achieved a complete response as the best response. The objective response and disease control rates were 48% (15/31) and 64% (20/31), respectively (Supplementary Fig 1C).

AXL expression was positive (> 1% TPS) in 47% of cases (47/89), with values ranging from 0% to 100% and a median of 5% (Fig 2A-B). In the original cohort, AXL positivity (defined by TPS > 1%) was associated with shorter PFS, with medians of 4.3 months for the AXL positive group and 5.3 months for the AXL negative group,  $p = 0.044$  (Fig 2C). There was no significant difference in OS ( $p = 0.208$ ) (Fig 2D).

We then analyzed patient survival according to both AXL status and the type of treatment received, differentiating between patients treated with IO and/or CT. PFS was significantly different ( $p = 0.007$ ) (Fig 2E). Pairwise comparisons revealed a significant difference between the IO-AXL negative group and the CT- AXL positive group ( $p = 0.008$ ) and CT- AXL negative group ( $p = 0.015$ ). No difference was noted among CT patients ( $p=1.00$ ). Similarly, no difference was found between IO-AXL positive patients and the CT group ( $p = 0.988$ ). Finally, a trend was observed in favor of the IO-AXL negative group compared to IO-AXL positive patients ( $p = 0.122$ ). Very similar results were observed in terms of overall survival (OS), with

a survival benefit being noted only for patients in the IO-AXL negative group ( $p = 0.018$ ) (Fig 2F).

To confirm the clinical relevance of this AXL positivity threshold, we performed a cumulative ROC analysis based on the different levels of AXL observed. For both PFS and OS, we identified an optimal threshold at 1% of positive tumor cells (Suppl Fig 2).

*Clinical outcomes for patients treated by chemotherapy and/or immunotherapy in the propensity-matched cohort according to AXL expression*

To account for potential prognostic factors imbalanced between the IO and CT groups, we performed a propensity score matching. We included common prognostic factors, such as age, BMI, sex, PD-L1 expression, ECOG performance status, and the presence of brain metastases. Table 2 presents the characteristics of patients in the IO ( $n = 37$ ) and CT ( $n = 52$ ) groups before and after matching. Significant differences were observed before matching various prognostic factors, such as age ( $p = 0.036$ ), PD-L1 expression ( $p = 0.001$ ), ECOG performance status ( $p = 0.025$ ), and the presence of brain metastases ( $p = 0.005$ ). After matching, 37 patients from the CT group were retained, with PD-L1 expression remaining the only statistically different factor ( $p < 0.01$ ).

We then confirmed the survival results observed in the initial cohort within the propensity-matched cohort. The results were similar, with better PFS in the IO-AXL negative group ( $p = 0.003$ ) and no difference between AXL negative and positive patients treated with CT. AXL positive patients treated with IO exhibited a response similar to those treated with CT alone (Fig 3A). No differences in outcomes related to AXL expression were observed for patients treated with CT alone. No differences were observed for patients treated with CT alone according to AXL expression. Similar results were observed for OS, with the IO-AXL negative group showing a favorable outcome (Fig 3B). In multivariate analysis, AXL expression was the only factor associated with shorter PFS (HR 4.15, 95% CI 1.35-12.82,  $p = 0.013$ ) (Fig 3C). This finding was consistent with the multivariate analysis for OS, where AXL expression had an HR of 5.634 (95% CI 1.75-18.15,  $p = 0.004$ ) (Fig 3D). As expected, the presence of brain metastases was also associated with shorter OS (HR : 7.23, 95% CI 1.23-42.60,  $p = 0.029$ ). A similar trend was observed for patients with a performance status of 2 (vs 0-1 : HR 2.71, 95% CI 0.73-10.0,  $p = 0.136$ ) (Supplementary table 1).

Thirty-one patients were evaluable according to RECIST criteria in the IO group, and thirty-four patients were evaluable in the CT group. Among patients in the CT group, 40% (6/15) and 53% (10/19) were in progression at the first assessment in the AXL negative and positive subgroups, respectively (data not shown). The response rates were 40% (6/15) and 16% (3/19), respectively. The disease control rates were 60% (9/15) and 47% (9/19), respectively (Fig 4A). Complete response was never observed. Among patients in the IO group, 14% (2/14) and 29% (5/17) were in progression at the first assessment in the AXL negative and positive subgroups, respectively. The response rates were 71% (10/14) and 51% (7/17), respectively. The disease

control rates were 85% (12/14) and 58% (10/17), respectively (Fig 4A). A complete response was observed in each IO sub-group (Fig 4B).

#### *Pathological and genomic profile associations with AXL expression*

No significant associations were observed between AXL expression and clinicopathological characteristics. Indeed, AXL did not differ statistically in relationship to PD-L1 expression ( $p = 0.66$ ), histological subtypes ( $p = 0.90$ ), regimen of treatment ( $p = 0.48$ ), or metastatic location (table 3). NGS data were available for 45 cases of adenocarcinoma, regardless of the treatment received in the first line. In the overall population, KRAS variants were the most frequently observed, occurring in 47% of cases (21/45), including activating KRAS G12C variant in 26% of cases (12/45). STK11 variants were the second most common alteration, identified in 31% of cases (14/45), followed by CDKN2A variants in 20% of cases (9/45) (Fig 5A). In subgroup analyses, KRAS G12C variants were found in 17% (4/23) of tumors with AXL negative status and 32% (8/22) of tumors with AXL positive status. STK11 variants were observed in 21% (5/23) of AXL-negative tumors and 41% (9/22) of AXL-positive tumors. BRAF variants were observed in 9% (2/23) of AXL-negative tumors and 18% (4/22) of AXL-positive tumors (Fig 5B). These associations thus suggest relationship between AXL expression and KRAS/STK11 variants.

## **Discussion**

There is a pressing need for innovative strategies to improve the effectiveness of IO in clinical settings, as well as for predictive tools that can accurately identify IO responders based on the characteristics of their tumor microenvironment. To our knowledge, this is the first study demonstrating the predictive capabilities of AXL expression for first-line IO responses in metastatic NSCLC. Our study has several strengths, including a cohort of 89 patients treated with IO in first line, controlled by a CT group, with a predictive effect specifically observed in the IO arm in terms of PFS and resulting in a significant OS benefit. These significant differences persisted after accounting for potential prognostic confounding factors through propensity score matching and multivariate analyses.

In NSCLC, it has been previously reported that AXL expression, evaluated by immunohistochemistry and using a cut-off of 25% of tumor cells, was statistically associated with lymph node involvement ( $p < 0.0001$ ) and a more advanced clinical stage ( $p < 0.0001$ ) [93]. The reported difference with significance thresholds of 25% and 0% may be due, in part, to the fact that our study included only metastatic stages with a criterion focused on response to immunotherapy, whereas the study by Shieh et al. predominantly included non-metastatic patients with criteria based on TNM staging. A complementary study on surgically resected lung adenocarcinoma tissues ( $n = 88$ ) evaluated mRNA and protein expression levels of both AXL and its ligand Gas6. Elevated levels of AXL mRNA/protein and Gas6 protein were significantly associated with poorer clinicopathological features and prognosis (5-year OS rates : AXL mRNA low: 72.3%, high: 49.7%,  $p = 0.047$ ; AXL protein low: 77.5%, high: 38.6%,  $p < 0.001$ ; Gas6 protein low: 70.5%, high: 48%,  $p = 0.042$ ). Conversely, higher Gas6 mRNA

expression correlated with better clinicopathological features and prognosis (5-year OS rates : Gas6 mRNA low: 59.2%, high: 81.8%,  $p = 0.054$ ). Multivariate analysis indicated that high AXL mRNA expression could be an independent factor for poorer prognosis ( $p = 0.04$ ) [94]. Comparing the thresholds used for this report for AXL quantification is not feasible with our study, as Masashi et al. employed a composite IHC score that integrates both staining intensity and the percentage of positive cells.

Considering resistance to treatment, AXL has been suggested as both a marker and a mechanism of resistance across various cancer types. Specifically, AXL has been recognized as a key factor in mediating drug resistance in ovarian cancer cell lines resistant to cisplatin [164]. In a comprehensive analysis of 643 human cancer cell lines, AXL was strongly linked to a drug-resistant mesenchymal phenotype. Moreover, the inhibition of AXL showed a pro-survival effect when combined with antimetabolic drugs like docetaxel [165]. AXL has been demonstrated to play a role in resistance to a range of cytotoxic agents, radiation, and various targeted therapies [166]. In metastatic NSCLC with EGFR variants, AXL expression has been described as a mechanism of resistance to EGFR TKIs [95,96]. Previous research has identified associations between AXL expression and resistance to various targeted therapies in NSCLC, including ALK, PARP, and VEGF/VEGFR-related therapies [167–170].

Numerous studies further indicate that AXL may be involved in resistance to IO. The TAM receptor superfamily, consisting of TYRO3, AXL, and MERTK, plays a crucial role in maintaining tissue and immune homeostasis [171]. Dysregulation of TAM receptor signaling has been linked to a range of diseases, including cancer, fibrosis, and viral infections. For example, TAM receptors are involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), maintaining stem cell phenotypes, immune modulation, proliferation, angiogenesis, and resistance to both conventional and targeted therapies [88,172]. EMT has already been reported as a mechanism of resistance to various drugs and therapeutic strategies in NSCLC [160]. AXL modulates cell signaling pathways and facilitates communication between different elements of the tumor microenvironment, such as cancer cells, endothelial cells, and immune cells.

Accumulating evidence suggests that AXL is a promising molecular target for addressing therapy resistance and immunosuppression, with AXL inhibitors showing the potential to enhance the effectiveness of immune checkpoint inhibitors [161]. Additionally, we observed that STK11 variants appeared to be more common in AXL-positive tumors. It has been previously reported that the presence of a STK11 variant was associated with a negative prognosis [173]. These factors collectively support that tumors expressing AXL may be less responsive to IO, as suggested by our data.

Despite including a substantial number of patients, the retrospective and single-center design of our study represents a limitation. Although we matched patients using propensity scores to account for potential prognostic variables, the level of PD-L1 expression remained incompletely balanced due to an inclusion bias, as patients receiving IO alone must have a PD-L1 expression of at least 50%. A larger, prospective, and multicenter study is needed to validate these findings.

Given that patients with NSCLC expressing AXL exhibit significantly less benefit from IO, this approach could help better identify those who are suitable candidates for this treatment. It could also prevent unnecessary exposure of patients to a combination of CT and IO, which is associated with an increased risk of toxicity. Furthermore, AXL is a receptor tyrosine kinase that is targetable with emerging inhibition strategies, including both tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and blocking antibodies [166]. For example, a phase II trial investigated the use of Bemcentinib (BGB324), a highly selective AXL inhibitor, in combination with IO (i.e. Pembrolizumab) for patients with advanced NSCLC [174]. Among 29 patients assessable for a response, 7 achieved a partial response, yielding a response rate of 24%. In patients with AXL-positive tumors, the objective response rate was 40%. Of the 5 responders for whom PD-L1 status was known, 4 (80%) were either PD-L1 negative or had low PD-L1 expression. During stage 1 of the trial, the median PFS was 4.0 months (95% CI 1.9 – NR) overall, and 5.9 months for AXL-positive patients (n = 10 ; 3.0 - NR). Targeting AXL could thus be a valuable strategy for patients, particularly in combination with IO, to prevent immune escape.

## **Conclusion**

We demonstrate for the first time that tumor expression of AXL is associated with a lack of benefit from immunotherapy compared to chemotherapy alone in the first-line treatment of metastatic NSCLC without targetable oncogenic addiction. AXL expression could serve as a biomarker to identify patients who would benefit from the addition of immunotherapy to their treatment regimen, and it may also act as a therapeutic target to restore sensitivity to immune checkpoint inhibitors. Further clinical studies are needed to fully assess the clinical relevance of this biomarker to allow better patient selection and optimal clinical management.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** CONSORT diagram of this study. aNSCLC : advanced Non-Small Cell Lung Cancer; CT: Chemotherapy; IO: Immunotherapy; EGFRm: Epidermal Growth Factor Receptor mutant; ALKt: Anaplastic Lymphoma Kinase translocation; NGS: Next-Generation Sequencing.

**Figure 2.** Illustrations of NSCLC cases classified as AXL negative (upper image) and AXL positive (lower image). The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . The distribution of AXL expression is plotted in panel (B). Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) are shown in panels (C-D) and (E-F), respectively, for the global cohort. Survival curves are presented according to AXL expression and treatment groups : Chemotherapy (CT) and Immunotherapy (IO).

**Figure 3.** Kaplan-Meier curves for (A) progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) in the propensity score-matched cohort according to AXL expression and treatment groups. Forest plot depicting factors associated with PFS (C) or OS (D) in multivariate analysis. CT : Chemotherapy; IO: Immunotherapy. PD-L1 : Programmed Death Ligand 1; TPS: Tumor Proportion Score; PS: Performance Status; CNS: Central Nervous System.

**Figure 4.** Best Overall Responses in the propensity score-matched cohort. Waterfall plots show the best percentage change from baseline in target lesions for patients with at least one evaluable target lesion according to RECIST v1.1 criteria ; data were available for 37 patients in the CT control group (A) 34 patients in the IO group (B). PD ; Progressive Disease, PR: Partial Response; CR: Complete Response; SD: Stable Disease.

**Figure 5.** Genomic landscape of NSCLC tumors according to AXL expression. (A) OncoPrint plot of the global original cohort demonstrating top recurrently altered genes. Both AXL and PD-L1 are expressed by TPS. The heatmap is ordered according to increasing values of AXL expression. (B) Frequencies of most commonly altered genes according to AXL expression. PD-L1 : Programmed death ligand-1.

**Supplemental Figure 1.** Kaplan-Meier curves for (A) progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) in the global original cohort according to treatment groups. (C) Waterfall plots show the best percentage change from baseline in target lesions for patients with at least one evaluable target lesion according to RECIST v1.1 criteria in the global original cohort ; data were available for 52 patients in the CT control group and 34 patients in the IO group. CT : Chemotherapy; IO: Immunotherapy. PD ; Progressive Disease, RP: Partial Response; RC: Complete Response; SD: Stable Disease.

**Supplemental Figure 2.** Evolution of the AUC of cumulative ROC curves for (A) progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) according to AXL levels. AUC : Area Under the Curve; ROC: Receiver Operating Characteristics.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

This retrospective observational study was approved by the University Hospital of Reims' data protection departments (MR004160420221). Information notices for non-opposition were sent to patients living at the time of data collection, in accordance with French law.

### **Consent for publication**

Not Applicable

### **Availability of data and material**

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### **Funding**

With financial support from ITMO Cancer of Aviesan within the framework of the 2021-2030 Cancer Control Strategy, on funds administered by Inserm, URCA and with financial support from the Amgen France Fund for Science and Humanity.

### **Authors' contributions**

AJ : conceptualization, software, methodology, formal analysis, visualization, writing original draft, writing–review, editing and he is the guarantor of this study. MD : conceptualization, writing–review, visualization and editing. BNR : writing–review, visualization and editing. VDa : writing–review, visualization and editing. VDo : writing–review, visualization and editing. NL : writing–review, visualization and editing. AD : writing–review, visualization and editing. GD : conceptualization, visualization, writing original draft, writing–review, editing. CG : conceptualization, visualization, writing original draft, writing–review, editing. MP : conceptualization, methodology, formal analysis, visualization, writing original draft, writing–review, editing.

### **Acknowledgments**

The research effort associated with this article was funded in part by the “Partenariat Hubert Curien-Tournesol”.

We thank the members of the Molecular Biology Platform and of the Molecular Oncology Department, University Hospital of Reims, for NGS routine analyses.

### **Conflict of interest**

JA reports participation in advisory boards and support for attending meetings from Roche, Pfizer, MSD, Bristol-Myers Squibb, Novartis, AstraZeneca, Takeda, Sanofi, and Amgen, outside of the submitted work. MD reports participation in advisory boards and support for attending meetings from Roche, Pfizer, MSD, Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, Chugai, Sanofi, and Amgen, outside of the submitted work. VDo reports support for attending meetings from AstraZeneca. GD reports participation in advisory boards and support for attending meetings from Chiesi, AstraZeneca, GSK, and Sanofi.

## Tables

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of the original cohort (n = 89)

	No. (%) [range]
	n = 89
Age, median	64 [42-83]
< 65 years	46 (51.7%)
≥ 65 years	43 (48.3%)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 [13.4-42.3]
Gender (Male / Female)	55 / 34
Smoking history	
Never / Former	61 (68.5%)
Current smokers	28 (31.5%)
PD-L1 expression (TPS)	
< 50 %	50 (56.2%)
≥ 50 %	32 (36%)
Unknown	7 (7.9%)
Histological sub-type	
Adenocarcinoma	64 (71.9%)
Squamous	22 (24.7%)
Other	3 (3.4%)
Stage *	
IIIA/IIIB	5 (5.6%)
IV	84 (94.4%)
Regimen	
CT alone	52 (58.4%)
IO alone	14 (15.7%)
CT-IO combination	23 (25.8%)
PS-ECOG	
0-1	78 (87.6%)
2	11 (12.4%)
Metastatic sites	
Liver metastasis	7 (7.9%)
CNS metastasis	22 (24.7%)

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, TPS: tumor proportion score, CT; Chemotherapy, IO: Immunotherapy, PS-ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status, CNS: central nervous system. Data are expressed as median [range] or n (%), as appropriate.

\* Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer

**Table 2.** Clinicopathological characteristics comparisons before and after propensity score matching.

Characteristics	Before matching, n (%)			After matching, n (%)		
	CT alone (n = 52)	IO +/- CT (n = 37)	p-value	CT alone (n = 37)	IO +/- CT (n = 37)	p-value
Age (years)	63.5 [42-81]	67 [47-83]	<b>0.04</b>	64 [42-78]	67 [47-83]	0.11
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23 [13.4-42.3]	23.5 [15.4-32.7]	0.50	22.4 [13.4-42.3]	23.5 [15.4-32.7]	0.61
Sex						
Female	16 (30.8%)	18 (48.6%)	0.14	13 (35.1%)	18 (48.6%)	0.35
Male	36 (69.2%)	19 (51.4%)		24 (64.9%)	19 (51.4%)	
Smoking history						
Never / Former	32 (61.5%)	29 (78.4%)	0.15	14 (37.8%)	29 (78.4%)	0.203
Current smokers	20 (38.5%)	8 (21.6%)		23 (62.2%)	8 (21.6%)	
PD-L1 expression (TPS)						
Negative*	29 (55.8%)	7 (18.9%)	<b>0.001</b>	20 (54.1%)	7 (18.9%)	<b>&lt; 0.01</b>
Positive	23 (44.2%)	30 (81.1%)		17 (45.9%)	30 (81.1%)	
Histological sub-type						
Non-squamous	36 (69.2%)	31 (83.8%)	0.19	24 (64.9%)	31 (83.8%)	0.11
Squamous	16 (30.8%)	6 (16.2%)		13 (35.1%)	6 (16.2%)	
Stage **						
IIIA/IIIB	4 (7.7%)	1 (2.7%)	0.59	4 (10.8%)	1 (2.7%)	0.35
IV	48 (92.3%)	36 (97.3%)		33 (89.2%)	36 (97.3%)	
Regimen						
CT alone	52 (100%)	-	-	37 (100%)	-	-
IO +/- CT	-	37 (100%)		-	37 (100%)	
PS-ECOG						
0-1	49 (94.2%)	29 (78.4%)	<b>0.03</b>	34 (91.9%)	29 (78.4%)	0.19
2	3 (5.8%)	8 (21.6%)		3 (8.1%)	8 (21.6%)	
Metastatic sites						
Liver metastasis	4 (7.7%)	3 (8.1%)	0.74	4 (10.8%)	3 (8.1%)	0.69
CNS metastasis	19 (36.5%)	3 (8.1%)	<b>&lt; 0.01</b>	5 (13.5%)	3 (8.1%)	0.71

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, TPS: tumor proportion score, CT; Chemotherapy, IO: Immunotherapy, PS-ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status, CNS: central nervous system. Data are expressed as Median [range] or n (%), as appropriate. p-value was considered significant if < 0.05. \* or unknown.

\*\* Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer

**Table 3.** Clinicopathological characteristics associated with AXL Expression in NSCLC patients from the propensity-matched cohort.

Characteristics	AXL expression (n = 74)		p-value
	AXL negative (n = 34)	AXL positive (n = 40)	
Age (years)	66.5 [53-83]	64 [42-80]	0.78
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 [16.8-36.7]	23.6 [13.4-42.3]	0.89
Sex			
Female	16 (47.1%)	15 (37.5%)	0.55
Male	18 (52.9%)	25 (62.5%)	
Smoking history			
Never / Former	25 (73.5%)	27 (67.5%)	0.76
Current smokers	9 (26.5%)	13 (32.5%)	
PD-L1 expression (TPS)			
Negative*	11 (32.4%)	16 (40%)	0.66
Positive	23 (67.6%)	24 (60%)	
Histological sub-type			
Non-squamous	26 (76.5%)	29 (72.5%)	0.90
Squamous	8 (23.5%)	11 (27.5%)	
Stage *			
IIIA/IIIB	2 (5.9%)	3 (7.5%)	0.85
IV	32 (94.1%)	37 (92.5%)	
Regimen			
CT alone	15 (44.1%)	22 (55%)	0.48
IO +/- CT	19 (55.9%)	18 (45%)	
PS-ECOG			
0-1	28 (82.4%)	35 (87.5%)	0.77
2	6 (17.6%)	5 (12.5%)	
Metastatic sites			
Liver metastasis	3 (8.8%)	4 (10%)	0.82
CNS metastasis	4 (11.8%)	4 (10%)	0.90

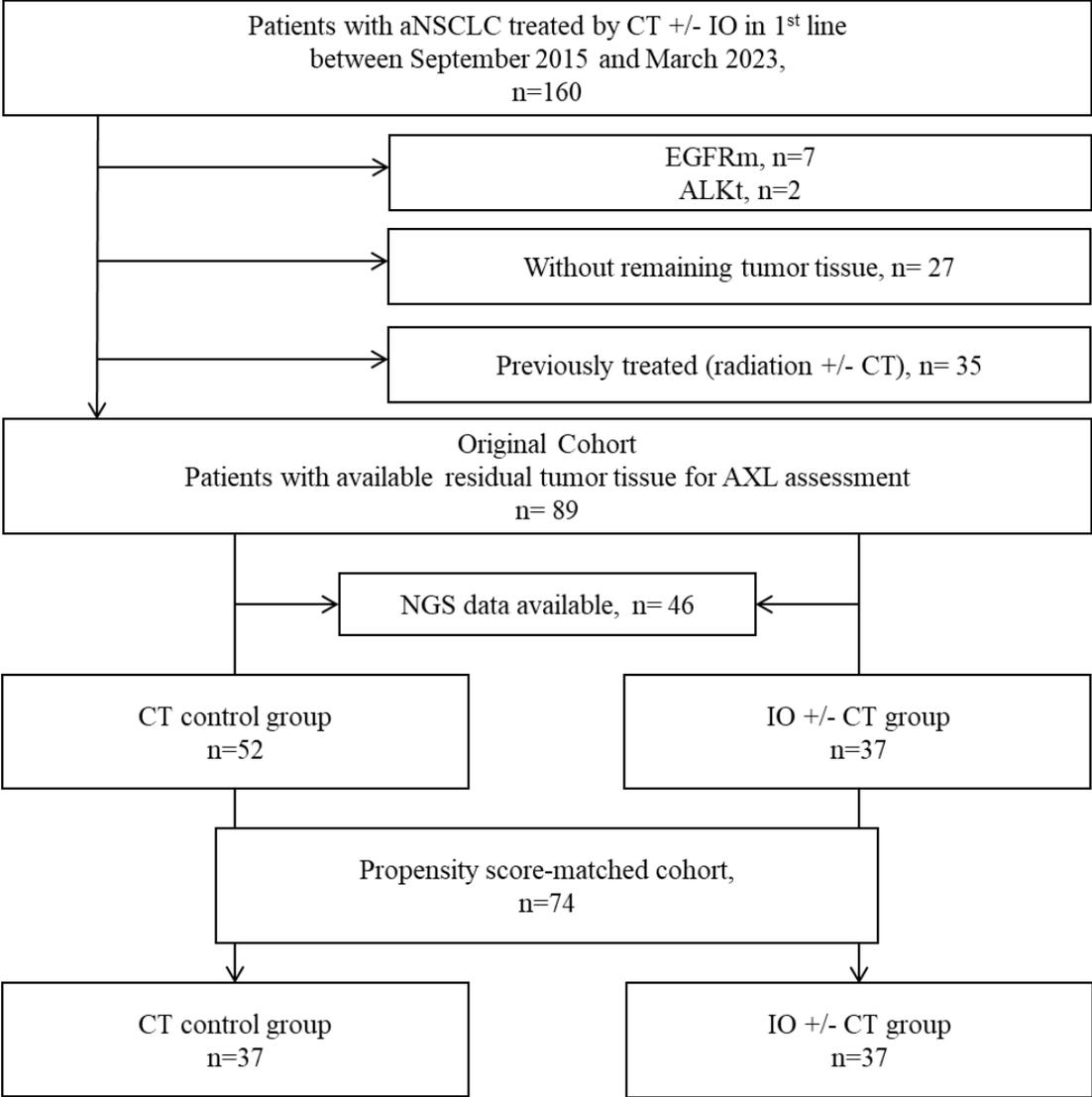
PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, TPS: tumor proportion score, CT; Chemotherapy, IO: Immunotherapy, PS-ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status, CNS: central nervous system. Data are expressed as Median [range] or n (%), as appropriate. p-value was considered significant if < 0.05. \* or unknown. \* Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer.

**Supplemental table 1.** Multivariate analysis by cox regression models on survival and progression-free survival among patients in the propensity score matching cohort

Factors	Progression-free survival		Overall survival	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age (years)	0.98 (0.91-1.05)	0.51	0.97 (0.91-1.05)	0.49
PS-ECOG 2 (vs 0-1)	0.84 (0.23-3.08)	0.79	2.71 (0.73-10.03)	0.14
PD-L1 expression (≥ 50% vs 0-49%*)	0.99 (0.97-1.01)	0.17	1 (0.98-1.02)	0.99
CNS metastasis	3.04 (0.34-27.11)	0.32	7.23 (1.23-42.59)	<b>0.03</b>
IO +/- CT (vs CT alone)	4.23 (0.84-21.39)	0.08	1.63 (0.31-8.54)	0.56
AXL positive (vs negative)	4.16 (1.35-12.82)	<b>0.01</b>	5.63 (1.75-18.15)	<b>&lt; 0.01</b>

HR : Hazard Ratio, CI: Confidence Interval, PS-ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status, PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, CNS: central nervous system, IO: Immunotherapy, CT: Chemotherapy. p-value was considered significant if < 0.05. \* or unknown

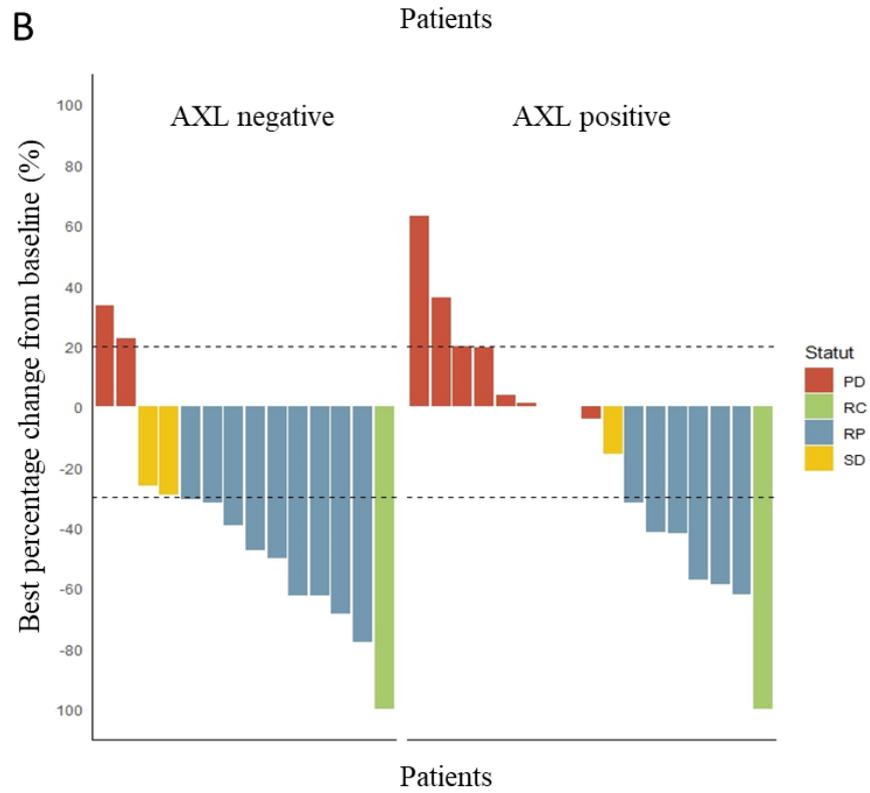
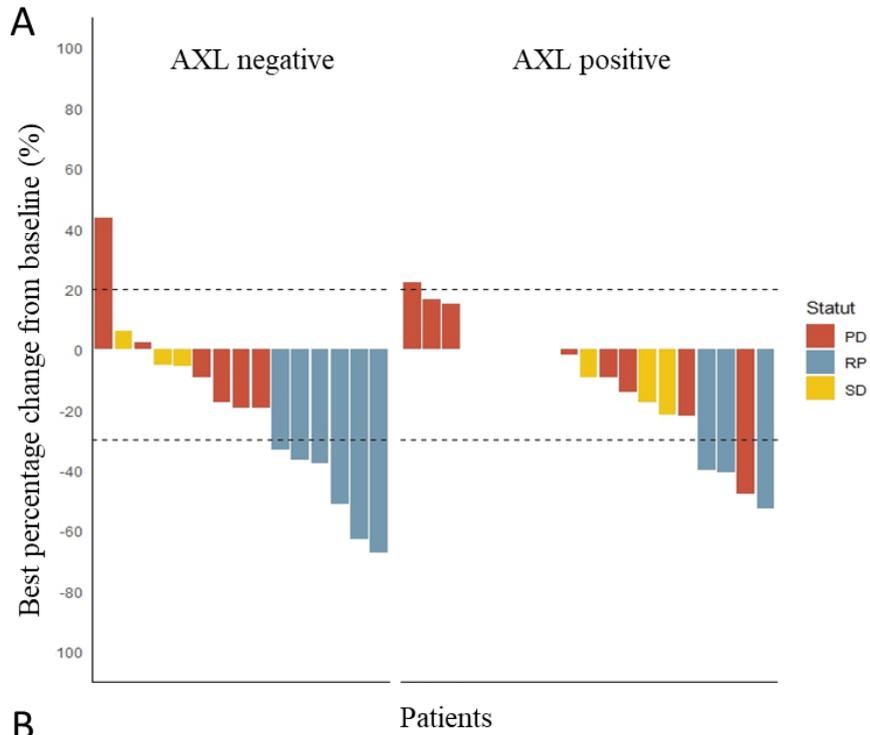
**Figures**



**Figure 1**

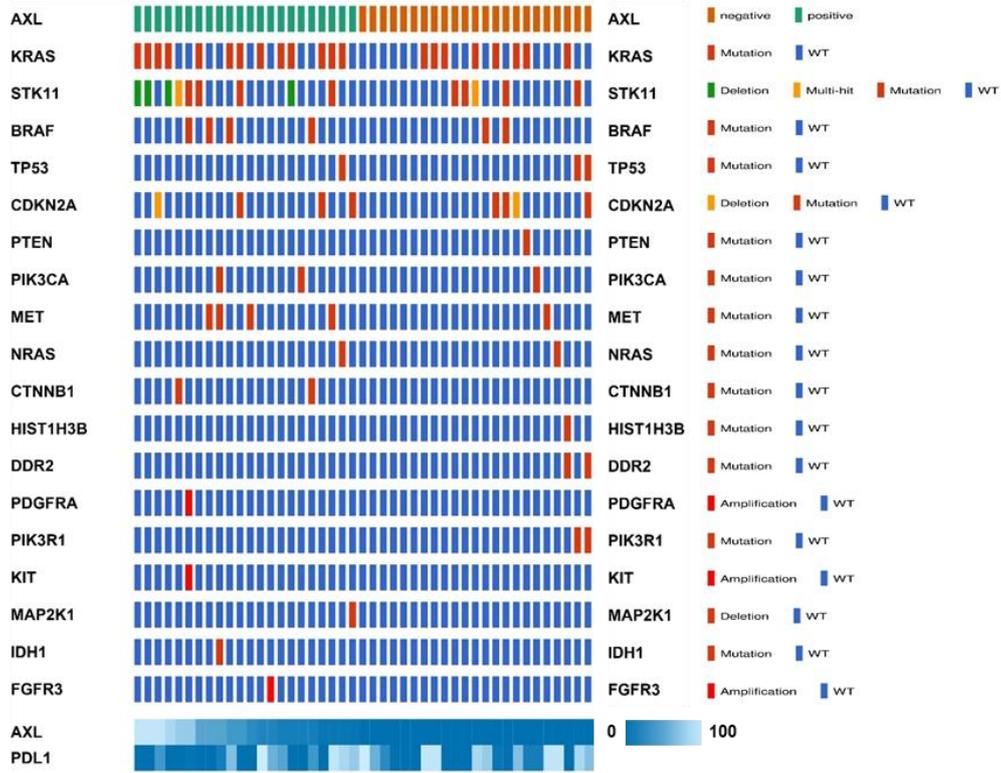






**Figure 4**

A



B

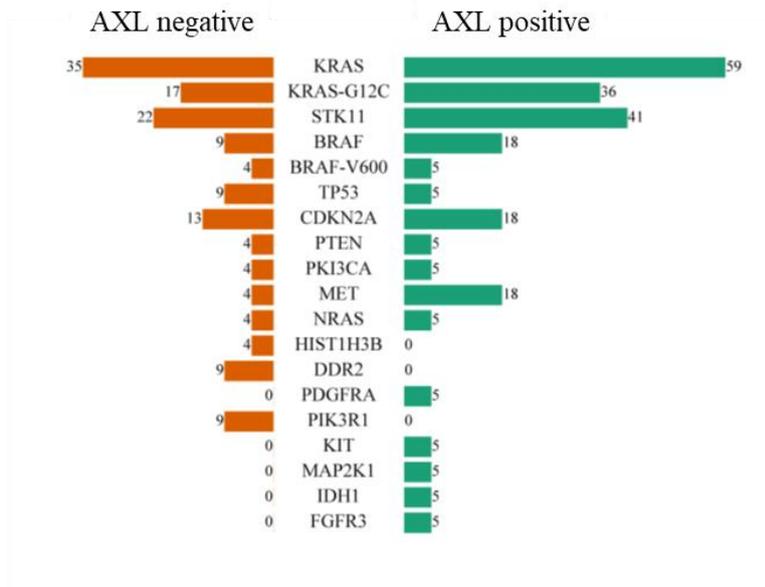
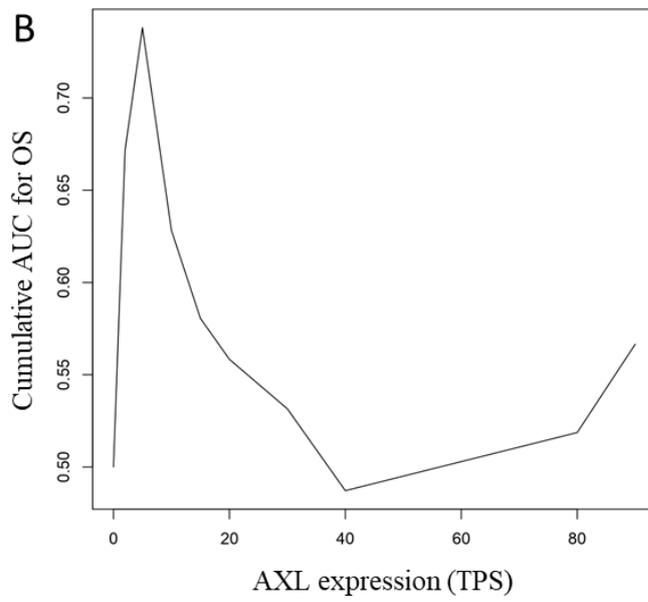
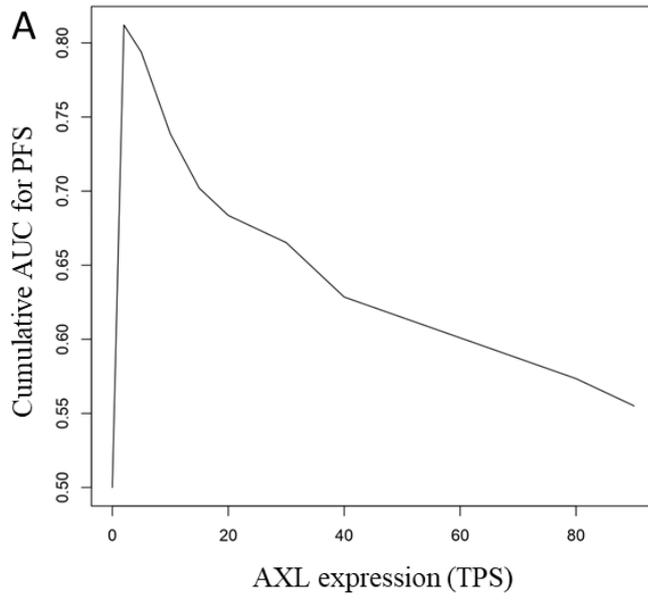


Figure 5





**Supplemental Figure 2**

## DISCUSSION - CONCLUSION

Dans ce manuscrit, nous démontrons plusieurs points clés concernant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et son association avec des profils immunitaires spécifiques.

Nous montrons ainsi que la TEM est intrinsèquement liée à un profil immunitaire caractérisé par l'expression de certaines chimiokines et cytokines propres aux cellules mésenchymateuses. Explorant la relation entre la TEM et les caractéristiques immunitaires de CBNPC, nous avons observé des profils distincts de cytokines et chimiokines en fonction des phénotypes mésenchymateux ou épithéliaux des tumeurs, tant dans les adénocarcinomes bronchiques que dans les carcinomes épidermoïdes, tout en établissant un score de TEM applicable aux deux types de CBNPC. Nous avons également relevé des corrélations significatives et positives entre la TEM et PD-L1 (CD274), ainsi que d'autres co-inhibiteurs immunitaires, suggérant une évitement immunitaire dans la plupart des tumeurs mésenchymateuses.

Puis nous avons souhaité simplifier et rendre notre concept applicable. La caractérisation de la TEM a été réduite à deux marqueurs d'intérêt : AXL et VIM. VIM est un marqueur canonique et bien établi des tumeurs mésenchymateuses, tandis qu'AXL est également associé à un phénotype mésenchymateux, avec l'avantage supplémentaire d'être une cible thérapeutique potentielle. Nos recherches ont ensuite révélé que les profils transcriptomiques des tumeurs exprimant à la fois VIM et AXL étaient associés à une probabilité de réponse à l'immunothérapie plus faible.

Nous discutons ici les deux aspects principaux de cette thèse à savoir la pertinence clinique de la TEM dans le CBNPC comme marqueur d'agressivité et son implication dans la réponse immunitaire antitumorale avec pour chaque aspect, un focus sur AXL.

### *La transition épithélio-mésenchymateuse : signature prédictive et agressivité tumorale*

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus biologique bien connu qui a fait l'objet de nombreuses études, notamment dans le contexte du cancer. Ce phénomène, par lequel des cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses, est associé à une plus grande capacité de migration, d'invasion et de résistance aux traitements. Au fil des années, la TEM a été largement reconnue pour son rôle clé dans la progression tumorale, la dissémination métastatique et le développement de résistance aux traitements.

Notamment, plusieurs études soulignent le rôle de la TEM dans la résistance aux chimiothérapies couramment utilisées, telles que le cisplatine, le paclitaxel, la gemcitabine et la vinorelbine [175–179]. La résistance au cisplatine, principal traitement de première ligne du CBNPC, est particulièrement liée aux caractéristiques mésenchymateuses, comme le confirment diverses données *in vitro* et *in vivo* [180–182]. Il en va de même pour la résistance au docétaxel, un médicament de deuxième ligne [183,184]. Ces processus étant souvent réversibles, ils offrent des perspectives thérapeutiques.

Au-delà de la prédiction de résistance par la TEM et malgré ces avancées, son application clinique reste cependant limitée.

Une des raisons de cet écueil réside potentiellement dans les méthodes de caractérisation de la TEM, principalement basée sur l'analyse de l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques. Classiquement, la TEM est identifiée par la diminution des marqueurs épithéliaux, tels que l'E-cadhérine, Claudines, Occludines, Cytokératines, et l'augmentation des marqueurs mésenchymateux, comme la vimentine (VIM), N-cadhérine et les facteurs de transcription tels que Snail, Slug, Twist et ZEB1/2. Ces analyses sont réalisées par immunohistochimie et/ou PCR quantitative (qPCR). Majoritairement, la caractérisation repose sur des signatures géniques associées à la TEM, dites "EMT scores", développées pour quantifier ce processus dans différents types de cancers. Cependant, ces méthodes restent souvent complexes et difficiles à appliquer en clinique de routine, en raison de la variabilité inter-tumorale et du manque de standardisation des approches. En témoigne de nombreuses publications rapportant des tumeurs classés comme mésenchymateuses et associées à des tumeurs cliniquement plus agressives. Cependant la plupart de ces classifications reposent sur des dizaines [144] voire centaines de gènes [185–187]. Quelques études sont parvenues à restreindre ces signatures de TEM à l'expression de quelques cibles comme en témoigne les travaux de Thompson et al., rapportant une signature basée sur 6 gènes épithéliaux (CDH1, CDH3, CLDN4, EPCAM, ST14 et MAL2) et 6 gènes mésenchymateux (VIM, SNAI2, ZEB2, FN1, MMP2 et AGER) [137]. D'autres travaux similaires sont également parvenus aux mêmes résultats sans toutefois parvenir à réduire ces signatures à quelques cibles transposables en routine.

Il faut toutefois noter que l'objectif de ces travaux visait à proposer des signatures permettant de caractériser la TEM dans un type de cancer voire d'identifier une signature de TEM pan-cancer. Notre approche se détache donc par l'identification de marqueurs associés à la TEM avec une sélection de ces marqueurs qui a été basée sur le postulat a priori d'une pertinence clinique de AXL comme cible thérapeutique. Cette approche originale en limite donc la portée sur cet aspect, ne permettant pas d'établir AXL (et VIM) comme marqueur le plus pertinent pour prédire la TEM bien que statistiquement associée.

*AXL, marqueur associé à la transition épithélio-mésenchymateuse et facteur de résistance aux traitements anticancéreux*

Nos investigations ont ensuite confirmé une forte corrélation entre les expressions élevées d'AXL et VIM et les caractéristiques mésenchymateuses, indiquées par l'expression de gènes associés à la TEM. Cette observation était cohérente à travers les lignées cellulaires de CBNPC, les adénocarcinomes et épidermoïdes bronchiques, conformément aux rapports antérieurs dans le CBNPC mutant EGFR et dans de nombreux autres cancers solides [115,149,150]. Les spécimens AXL<sup>élevé</sup>/VIM<sup>élevé</sup> présentaient systématiquement un score de TEM plus élevé, indiquant leur nature mésenchymateuse et permettant de simplifier la caractérisation de la TEM à l'expression de ces deux protéines, renforçant ainsi son applicabilité clinique [151].

Concernant la résistance au traitement, AXL a été suggéré comme un marqueur et un mécanisme de résistance dans divers types de cancer. Spécifiquement, AXL a été reconnu comme un facteur clé de médiation de la résistance thérapeutique dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine [164]. Dans une analyse complète de 643 lignées cellulaires de cancer humain, AXL était fortement lié à un phénotype mésenchymateux résistant aux cytotoxiques [165]. AXL a démontré son implication dans la résistance à une gamme

d'agents cytotoxiques, de rayons ionisants et de diverses thérapies ciblées [166]. Dans le CBNPC métastatique avec mutations EGFR, l'expression d'AXL a également été décrite comme un mécanisme de résistance aux ITKs anti-EGFR [95,96]. Des recherches antérieures ont également identifié des associations entre l'expression d'AXL et la résistance à d'autres thérapies ciblées dans le CBNPC, y compris les thérapies liées à ALK, PARP et VEGF/VEGFR [167–170].

#### *Transition épithélio-mésenchymateuse : mécanisme d'échappement immunitaire*

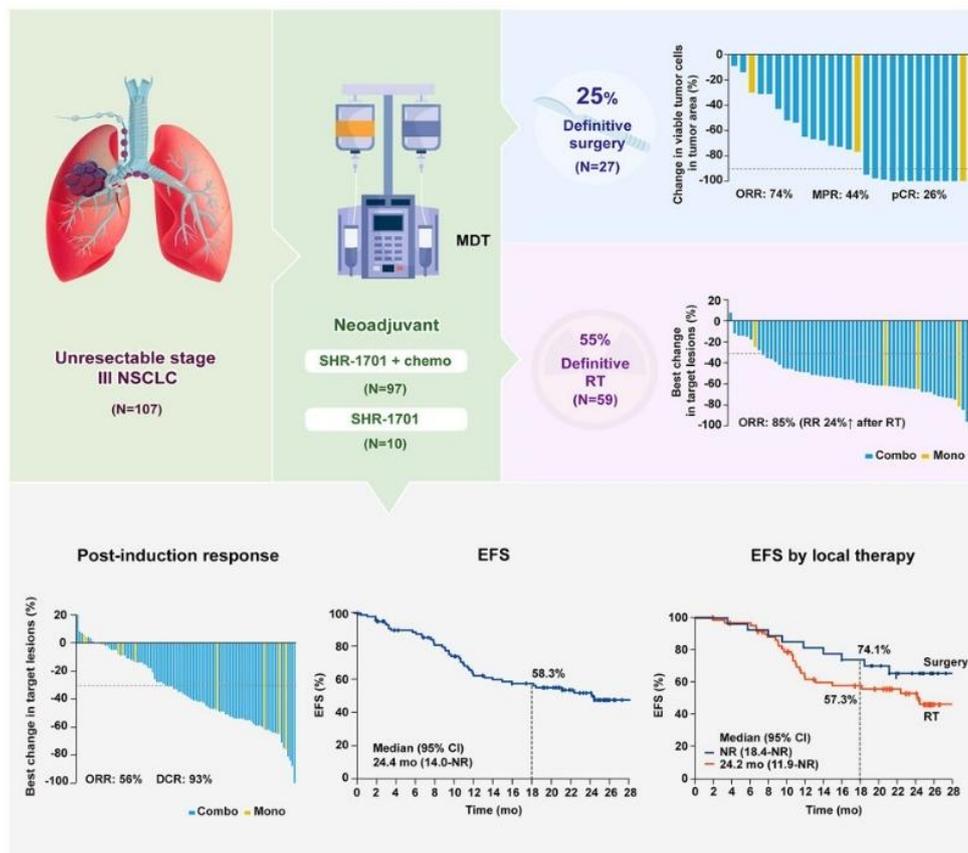
En approfondissant les traits immunitaires associés à la TEM dans les tumeurs pulmonaires, nous avons constaté que les tumeurs mésenchymateuses affichaient globalement une immunorésistance accrue. Cela se traduisait par des niveaux élevés d'ARNm de plusieurs inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans les tumeurs mésenchymateuses AXL<sup>élevé</sup>/VIM<sup>élevé</sup>, y compris PD-L2, TNFRSF8, LAG3, CTLA4 et TIGIT. La charge mutationnelle tumorale (TMB), couramment proposé comme marqueur de réponse à l'IO lorsqu'elle est élevée, variait également en fonction de la TEM : les tumeurs mésenchymateuses avaient une TMB plus faible que les tumeurs épithéliales, suggérant une moindre réponse immunitaire intrinsèque pour les tumeurs mésenchymateuses [148]. De plus, l'inflammation et l'activation chronique de l'IFN $\gamma$  étaient plus impactées dans les tumeurs mésenchymateuses, comme précédemment rapporté, suggérant que la TEM pourrait favoriser un microenvironnement immunosuppresseur [153].

En accord avec nos observations, d'autres études ont également rapporté une relation complexe entre la TEM et le système immunitaire. Par exemple, les traitements anti-PD-1 ont montré une efficacité dans le cancer urothélial métastatique en présence de cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et d'une TMB élevée, tandis que la résistance était corrélée à la signalisation TGF $\beta$  dans les fibroblastes, suggérant que le TGF $\beta$  limite l'immunité antitumorale en empêchant l'infiltration des cellules T dans les tumeurs mésenchymateuses [106,154]. Des observations similaires ont été publiées dans le mélanome métastatique [140].

L'expression différentielle de chimiokines et cytokines entre les tumeurs mésenchymateuses et épithéliales a également mis en évidence des profils immunitaires distincts associés à la TEM dans le CBNPC, notamment avec une réduction de l'infiltration des cellules T dans les tumeurs mésenchymateuses [146,155]. Considérant ces données et nos observations, cela souligne la complexité du MET et soutient la capacité des tumeurs mésenchymateuses à créer un microenvironnement immunosuppresseur et une niche spécifique entravant l'efficacité des immunothérapies [146,155].

Ainsi, le ciblage de la TEM apparaît comme potentiellement pertinent. C'est d'ailleurs cette stratégie qui est désormais rendue possible par le développement technologique. Il a par exemple été mené un essai de phase 2 TRAILBLAZER, pour évaluer en néoadjuvant chez des patients atteints de CBNPC de stade III non résécable, le SHR-1701, une protéine de fusion bifonctionnelle ciblant PD-L1 et TGF $\beta$ , avec ou sans chimiothérapie, suivi d'une chirurgie ou d'une radiothérapie puis d'une consolidation au SHR-1701 (figure 31) [188]. Dans la cohorte primaire de patients recevant la thérapie combinée néoadjuvante (n = 97), les deux critères d'évaluation principaux ont été atteints, avec un taux de réponse objective post-induction de 58

% (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 47–68) et de survie sans événement (EFS) à 18 mois de 56,6 % (IC à 95 % : 45,2–66,5). Au total, 27 (25 %) patients ont subi une intervention chirurgicale ; tous ont obtenu une résection R0. Parmi eux, 12 (44 %) réponses pathologiques majeures et sept (26 %) réponses pathologiques complètes ont été enregistrées. Le taux de survie sans événement à 18 mois était de 74,1 % (IC à 95 % : 53,2–86,7) chez les patients opérés et de 57,3 % (43,0–69,3) chez les patients traités par radiothérapie. Ainsi, le traitement néoadjuvant par SHR-1701 avec chimiothérapie, suivi d'une chirurgie ou d'une radiothérapie, a montré une efficacité prometteuse avec un profil de sécurité tolérable chez les patients atteints d'un CBNPC de stade III non résecable.



**Figure 31** : Principaux résultats de l'étude de phase 2 TRAILBLAZER, évaluant le SHR-1701 (d'après [188]).

### *AXL comme marqueur clé de la résistance à l'immunothérapie*

Souhaitant pallier la principale limite des données précédentes basées sur des analyses transcriptomiques modélisant une sensibilité théorique à l'immunothérapie, nous avons donc conduit cette évaluation au travers d'une étude clinique rétrospective. Cette étude a inclus 89 patients ayant reçu un traitement de première ligne pour un CBNPC métastatique. Nous avons ainsi démontré que l'expression d'AXL était prédictive d'une moins bonne réponse au traitement, d'une survie sans progression réduite et d'une survie globale diminuée. Ces observations étaient spécifiques aux patients sous immunothérapie, sans différence notable pour ceux traités par chimiothérapie seule. Ces différences significatives ont persisté après avoir pris

en compte les facteurs de confusion pronostiques potentiels par appariement de scores de propension et analyses multivariées.

À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer les capacités prédictives de l'expression d'AXL pour les réponses aux IO en première ligne dans le CBNPC métastatique. Dans le CBNPC, il a été précédemment rapporté que l'expression d'AXL, étudiée par immunohistochimie avec un seuil de 25% de cellules tumorales, était statistiquement associée à l'implication des ganglions lymphatiques ( $p < 0,0001$ ) et à un stade clinique plus avancé ( $p < 0,0001$ ) [93]. Une étude complémentaire sur des tissus d'adénocarcinomes pulmonaires réséqués chirurgicalement ( $n = 88$ ) a évalué les niveaux d'expression de l'ARNm et des protéines d'AXL et de son ligand Gas6 [94]. Des niveaux élevés d'ARNm/protéine d'AXL et de protéine Gas6 étaient significativement associés à des caractéristiques clinico-pathologiques plus défavorables et à un pronostic moins bon (taux de survie à 5 ans : AXL ARNm faible : 72,3 %, élevé : 49,7 %,  $p = 0,047$  ; AXL protéine faible : 77,5 %, élevé : 38,6 %,  $p < 0,001$  ; Gas6 protéine faible : 70,5 %, élevé : 48 %,  $p = 0,42$ ). Inversement, une expression plus élevée de l'ARNm de Gas6 était corrélée à de meilleures caractéristiques clinico-pathologiques et à un meilleur pronostic (taux de survie à 5 ans : Gas6 ARNm faible : 59,2 %, élevé : 81,8 %,  $p = 0,054$ ). L'analyse multivariée a indiqué que l'expression élevée de l'ARNm d'AXL pourrait être un facteur indépendant de mauvais pronostic ( $p = 0,04$ ).

De nombreuses études indiquent qu'AXL pourrait être impliqué dans la résistance aux IO. La superfamille des récepteurs TAM, composée de TYRO3, AXL et MERTK, joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et immunitaire [171]. La dérégulation de la signalisation des récepteurs TAM a été liée à une gamme de maladies, y compris le cancer, la fibrose et les infections virales. Par exemple, les récepteurs TAM sont impliqués dans la TEM, le maintien des phénotypes de cellules souches, la modulation immunitaire, la prolifération, l'angiogenèse et la résistance à la fois aux thérapies conventionnelles et ciblées [88,172]. La TEM a déjà été rapportée comme un mécanisme de résistance à divers médicaments et stratégies thérapeutiques dans le CBNPC [160]. En se liant à son ligand GAS6, AXL module les voies de signalisation cellulaire et facilite la communication entre les différents éléments du MET, tels que les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires.

Concernant les stratégies d'inhibition, cibler AXL implique tout d'abord de prendre en compte le profil de tolérance de cette inhibition. L'inhibition des récepteurs TAM et de leurs ligands GAS6 et la protéine S1 dépendante de la vitamine K (PROS1) pourraient avoir des effets indésirables potentiels en clinique. L'inhibition des récepteurs TAM et de leurs ligands peut compromettre la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et les cellules dendritiques, entraînant l'accumulation de cellules apoptotiques [189]. Des réponses auto-immunes pourraient ainsi se produire, effets indésirables déjà rapportés sous IO avec un risque de potentialisation [190]. De plus, l'inhibition des récepteurs TAM pourrait avoir des effets indésirables potentiels sur la fonction plaquettaire et la coagulation, étant donné que ces récepteurs régulent la thrombose et l'hémostase [191]. Dans les essais de phase précoce, majoritairement conduit en combinaison avec des anti-EGFR, les inhibiteurs de AXL, qu'ils soient sous la forme d'ITK, d'anticorps bloquants ou conjugués, étaient associés à un profil de tolérance jugé acceptable sans signal de sécurité particulier [134].

Des preuves accumulées suggèrent qu'AXL est une cible moléculaire prometteuse pour aborder la résistance aux thérapies et l'immunosuppression. De plus, nous avons observé que les mutations STK11 semblaient être plus courantes dans les tumeurs positives pour AXL. Il a été précédemment rapporté que la présence d'une mutation STK11 était associée à un pronostic négatif [173]. Ces facteurs soutiennent collectivement l'idée que les tumeurs exprimant AXL peuvent être moins réceptives aux IO, comme le suggèrent nos données.

Malgré l'inclusion d'un nombre substantiel de patients, la conception rétrospective et monocentrique de notre étude représente une limitation. Bien que nous ayons apparié les patients en utilisant des scores de propension pour tenir compte des variables pronostiques potentielles, le niveau d'expression de PD-L1 est resté incomplètement équilibré en raison d'un biais d'inclusion, car les patients recevant une IO seule doivent avoir une expression de PD-L1 d'au moins 50%. Une étude plus large, prospective et multicentrique serait nécessaire pour valider ces résultats.

Étant donné que les patients atteints de CBNPC exprimant AXL bénéficient significativement moins des IO, cette approche pourrait aider à mieux cibler les patients candidats pour ce type de traitement. Elle pourrait également prévenir l'exposition inutile des patients à une combinaison de chimiothérapie et d'IO, qui est associée à un risque accru de toxicité. Au-delà d'écarter les patients d'une option thérapeutique, AXL est un RTK qui est ciblable avec des stratégies d'inhibition émergentes, comprenant des ITKs et anticorps bloquants [166]. Par exemple, un essai de phase II a évalué le Bemcentinib (BGB324), un inhibiteur hautement sélectif d'AXL, en combinaison avec le Pembrolizumab pour des patients atteints de CBNPC avancé [174]. Parmi les 29 patients évaluable pour la réponse, 7 ont obtenu une réponse partielle, soit un taux de réponse de 24%. Chez les patients ayant des tumeurs positives pour AXL, le taux de réponse objective était de 40%. Parmi les 5 répondeurs pour lesquels le statut PD-L1 était connu, 4 (80%) étaient soit négatifs pour PD-L1 soit avaient une faible expression de PD-L1. Pendant la phase 1 de cet essai, la médiane de PFS était de 4,0 mois (IC à 95% 1,9 – NR) dans l'ensemble, et de 5,9 mois pour les patients positifs pour AXL (n = 10 ; 3,0 - NR). Cibler AXL pourrait donc être une stratégie précieuse pour les patients, en particulier en combinaison avec l'IO, afin de prévenir l'évasion immunitaire.

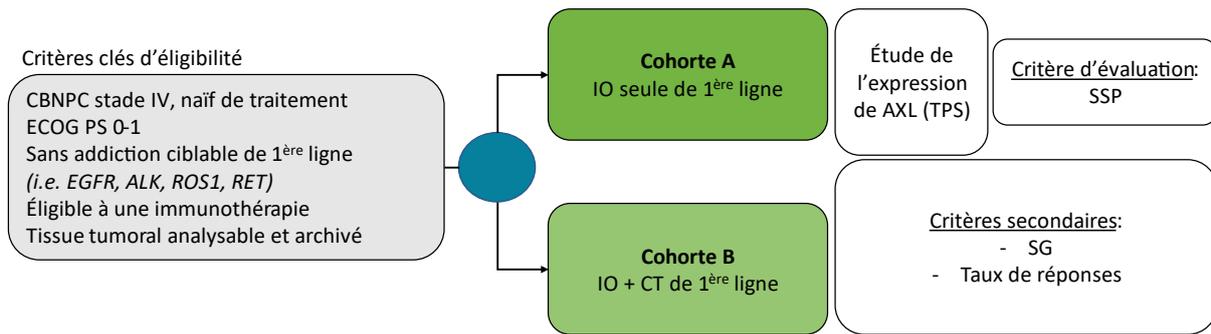
Nos travaux mettent en lumière que la présence d'une TEM caractérisée par l'expression de VIM et AXL est associée à un profil immunitaire défavorable quant à une réponse aux inhibiteurs de points de contrôle chez les patients atteints de CBNPC. De plus, nous avons montré que l'expression d'AXL dans des tumeurs de CBNPC métastatiques prédisait la résistance à l'immunothérapie. Ces découvertes pourraient avoir des implications significatives pour le développement de stratégies clinique personnalisées tout comme le développement d'approche thérapeutique ciblant AXL en combinaison à l'immunothérapie.

## PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail reposent essentiellement sur la mise en place d'études cliniques supplémentaires et d'études biologiques sur la tumeur elle-même pour évaluer pleinement la pertinence d'AXL comme marqueur de résistance et de permettre ainsi une meilleure prise en charge des patients atteints de CBNPC.

### 1. Intérêt de AXL dans le CBNPC : point de vue clinique

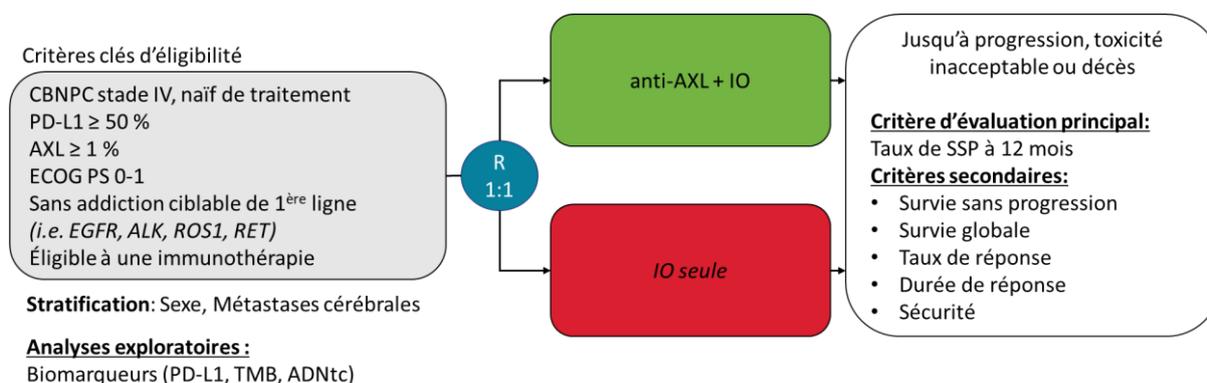
Concernant l'identification des patients atteints d'un CBNPC métastatique susceptibles de bénéficier de l'immunothérapie, nos données suggèrent que les patients présentant une tumeur AXL négative seraient ceux qui en tireraient le moins de bénéfice. Cependant, les limites exposées précédemment nécessitent une confirmation avec une puissance statistique et un design plus robuste que nous proposons ci-dessous (figure 32).



**Figure 32** : Proposition de design d'une étude observationnelle multicentrique pour confirmer l'intérêt de AXL pour prédire la réponse à l'immunothérapie, qu'elle soit administrée seule (cohorte A) ou en combinaison à une chimiothérapie (cohorte B).

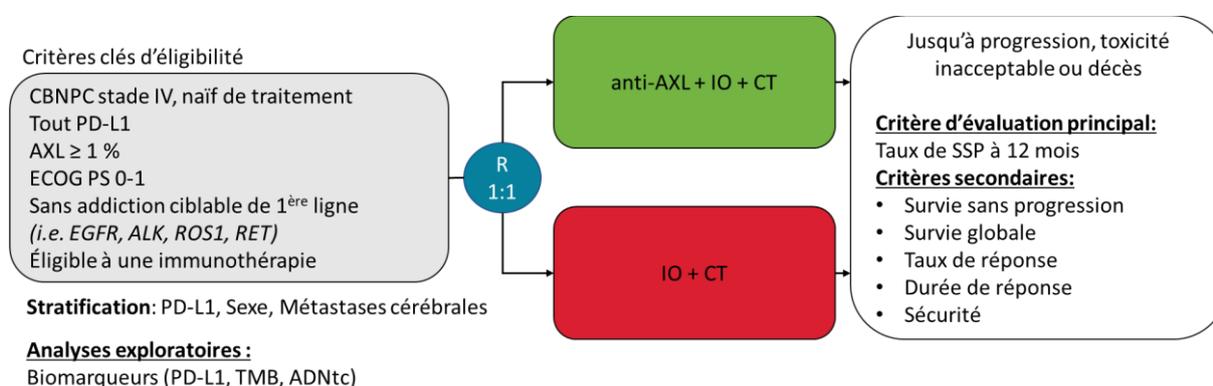
De plus, nous n'avons à ce jour aucune données évaluant la prédiction d'un bénéfice à l'immunothérapie selon l'expression d'AXL sur les stades non-métastatiques avec exposition au Durvalumab post-radio chimiothérapie ni même dans les situations néoadjuvantes. Ces études doivent être réalisées.

Anticipant une confirmation de ces données, il pourrait être envisagé de conduire un essai randomisé, basé sur l'expression d'AXL comme biomarqueur servant à identifier la population cible. Les patients exprimant un PD-L1  $\geq$  50% peuvent actuellement recevoir une immunothérapie seule, ce qui constituerait un bras contrôle, qui sous-performerait dans notre hypothèse en cas d'expression de AXL par la tumeur. Le bras expérimental proposerait donc la combinaison d'une immunothérapie avec un inhibiteur d'AXL, dans l'optique d'antagoniser ses effets pro-tumoraux et anti-immunitaires (figure 33).



**Figure 33 :** Proposition de design d'une étude interventionnelle de phase 2 en cas de PD-L1  $\geq$  50% et expression d'AXL ( $\geq$  1%) évaluant l'intérêt d'un inhibiteur d'AXL en combinaison à une immunothérapie seule de 1<sup>ère</sup> ligne.

Ce type de design limite le risque d'interaction clinico-biologique potentiellement observée en cas de combinaison de la chimiothérapie avec l'immunothérapie. Cela risquerait cependant de restreindre l'essai à une sous-population d'effectif limité par les critères d'une forte expression du PD-L1 (figure 34). Le design suivant pourrait alors être envisagé indépendamment de l'expression du PD-L1 avec cette fois-ci, un bras contrôle basé sur la chimio-immunothérapie.



**Figure 34 :** Proposition de design d'une étude interventionnelle de phase 2 en cas d'expression de AXL ( $\geq$  1%), évaluant l'intérêt d'un inhibiteur d'AXL en combinaison à une chimio-immunothérapie seule de 1<sup>ère</sup> ligne.

Ce design comporte l'avantage d'inclure une population beaucoup plus large mais ajoute la difficulté d'absence de donnée à l'heure actuelle sur la sécurité d'une combinaison chimiothérapie + immunothérapie + inhibiteur d'AXL. Dans l'ensemble de ces scénarios, il conviendrait d'établir la meilleure modalité thérapeutique permettant de cibler AXL.

Il reste également à comprendre comment l'expression d'AXL affecte la réponse immunitaire. Plusieurs hypothèses sont évoquées telle que le défaut de priming, l'exclusion de cellules immunitaires du MET, ou encore l'épuisement lymphocytaire précoce. Des travaux sont ainsi en cours avec établissement d'un modèle *ex vivo* permettant l'étude de la réponse immunitaire provenant de tumeurs non-prétraités.

## 2. Intérêt de AXL dans le CBNPC : point de vue biologique

Les données issues de nos travaux indiquent qu'AXL pourrait jouer un rôle clé en tant que biomarqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie dans le carcinome bronchique non à petites cellules. Pour confirmer ces premières observations, nous avons exploré les facteurs anatomopathologiques associés à l'expression d'AXL, notamment les caractéristiques histologiques ainsi que l'infiltration en cellules immunitaires. Nous avons également souhaité étudier *ex vivo* la réponse à l'immunothérapie sur des tumeurs. Ces modèles permettent d'étudier la dynamique des interactions entre les cellules tumorales exprimant AXL et le microenvironnement immunitaire dans des conditions plus contrôlées et imitant les scénarios cliniques.

### 2.1. Evaluation d'AXL dans une cohorte de CBNPC localisés

Nous avons examiné l'expression du récepteur AXL au sein de CBNPC à partir de prélèvements non biaisés par un échantillonnage spatial lié aux biopsies, comme observé dans les stades métastatiques. Pour ce faire, nous avons identifié 95 CBNPC réséqués chirurgicalement, dont les caractéristiques principales sont présentées dans le tableau 3.

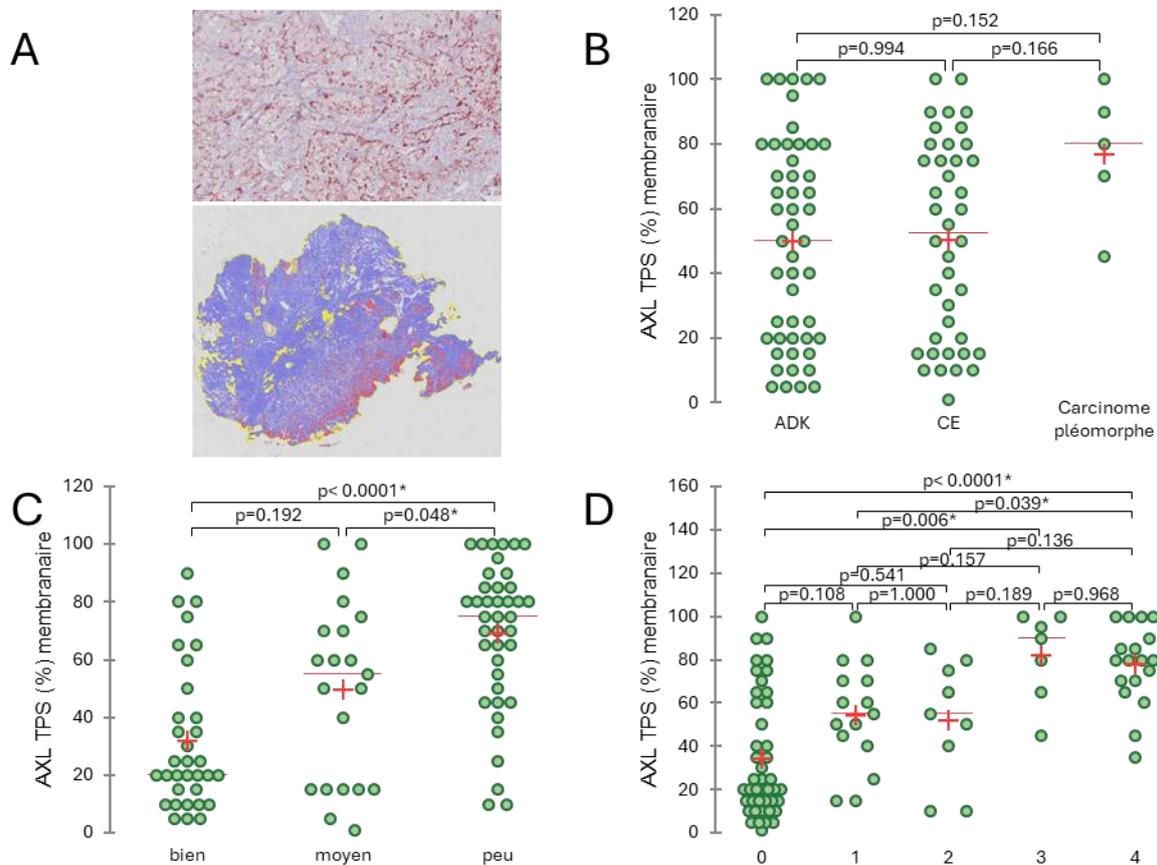
	No. (%) ou moyenne (écart-type)
PD-L1 (%)	20 (32)
Sous-type histologique	
Adénocarcinome	50 (52.6%)
Carcinome épidermoïde	40 (42.1%)
Autres (pléomorphe)	5 (5.3%)
Degré de différenciation	
Bien différencié	33 (34.7%)
Moyennement différencié	21 (22.1%)
Peu différencié	41 (43.1%)
Stade *	
Stade I	37 (38.9%)
Stade II	24 (25.3%)
Stade III	28 (29.5%)
Indéterminé	6 (6.3%)

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1, TPS: tumor proportion score. Les données sont exprimées en médiane (écart-type) ou effectif (pourcentage). \* Selon la 8ème édition de la classification TNM du cancer pulmonaire.

**Tableau 3 :** Caractéristiques principales des 95 CBNPC inclus dans l'évaluation d'AXL.

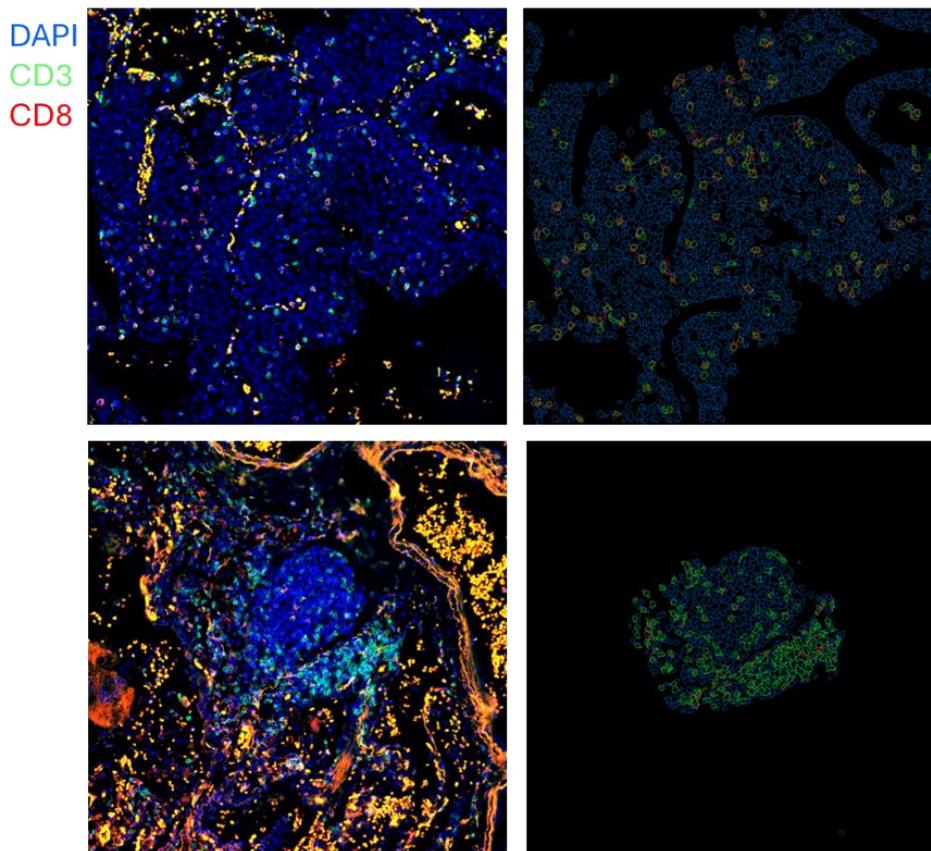
Sur les coupes tissulaires de ces 95 CBNPC, nous avons réalisé une segmentation cellulaire à l'aide du logiciel d'analyse d'image QuPath. S'en est suivie une classification de l'ensemble des cellules détectées et une quantification du pourcentage de cellules tumorales positives pour AXL. Les cellules sont considérées positives lorsqu'elles présentent un marquage membranaire, selon la méthode dite du TPS (Tumor Proportion Score) (figure 35A). Nos résultats montrent que l'expression d'AXL allait de 1 à 100% avec une moyenne de 51%. Aucune association significative n'a été observée entre l'expression d'AXL et le sous-type histologique en dehors d'une tendance à l'augmentation pour les carcinomes pléomorphes (figure 35B). Cependant, l'expression d'AXL était significativement augmentée en cas de tumeur faiblement

différenciée, en comparaison avec les tumeurs moyennement différenciées ( $p = 0.048$ ) et bien différenciées ( $p < 0.0001$ ) (figure 35C). De façon intéressante, l'expression de AXL était également significativement associée avec l'expression de la vimentine par les cellules tumorales : les tumeurs ayant plus de 50% de cellules tumorales exprimant la vimentine (classe 4) avaient une expression de AXL plus élevée en comparaison avec les tumeurs sans aucune expression de vimentine par leur cellules tumorales (classe 0) ( $p < 0.0001$  ; figure 35D). Aucune association n'était cependant retrouvée entre l'expression du PD-L1 et de AXL ( $r=0.186$ ,  $p = 0.073$ ).



**Figure 35 :** AXL est associé à des caractéristiques de tumeurs mésenchymateuses. A. Représentation d'une tumeur exprimant AXL (figure supérieure) et méthode de quantification (TPS) assistée par l'outil QuPath (figure inférieure). Niveaux d'expression de AXL selon le sous-type histologique (B), degré de différenciation (C) et le niveau d'expression de vimentine (D).

Puis nous avons également évalué l'environnement immunitaire des tumeurs pour comparer une éventuelles différence selon l'expression de AXL par les cellules tumorales. Pour cela un double marquage CD3 et CD8 a été réalisé pour mesurer le pourcentage de lymphocyte cytotoxique CD8 avec une distinction entre les compartiments intra-tumoral et péri-tumoral. Pour chacun des compartiments, 3 zones ont été acquises soit 6 au total par échantillon pour 92 tumeurs évaluables. L'analyse a été réalisée par un logiciel de traitement d'images (CellProfiler). Il n'était pas observé de variation sur le ratio CD3/CD8, qu'il soit intra-tumoral ( $p = 0.63$ ) ou péri-tumoral ( $p = 0.24$ ) (figure 36).



**Figure 36 :** Illustration d'une zone intra-tumorale (panel supérieur) et péri-tumorale (panel inférieur) avec marquages nucléaire (DAPI), CD3 (vert) et CD8 (rouge) (panel de gauche) et après segmentation par CellProfiler (panel de droite).

Les travaux préliminaires que nous avons réalisés ne semblent pas démontrer de modification significative du microenvironnement tumoral dans sa composition immunitaire. Toutefois, des limites ont été identifiées, notamment un biais d'échantillonnage des zones analysées pour quantifier les marqueurs CD3 et CD8. Pour surmonter ces limitations, une méthode d'analyse non biaisée a été mise au point, permettant d'étudier l'ensemble de l'échantillon de manière plus exhaustive. Actuellement, nous procédons à une quantification exhaustive des échantillons, incluant non seulement les marqueurs CD3 et CD8, mais aussi CD4 et FOXP3, qui sont des acteurs clés dans la réponse immunitaire. Cette approche nous permettra de cartographier la composante immunitaire principale associée au CBNPC exprimant AXL.

Avec cette approche complémentaire, nous souhaitons également évaluer l'interaction cellulaire dans sa dimension spatiale. Nous procédons ainsi à des mesures de distances intercellulaires (minimales, moyennes et maximales) entre les différentes populations immunitaires d'intérêt (CD3, CD8, CD4, FOXP3) et les cellules tumorales, en fonction de leur niveau d'expression d'AXL. Cette analyse spatiale permettra de mieux comprendre les interactions potentielles entre les cellules immunitaires et tumorales, et de déterminer si la proximité des cellules immunitaires est influencée par l'expression d'AXL, facteur potentiel de modulation du microenvironnement tumoral.

## 2.2. Evaluation de la résistance dans un modèle de culture *ex-vivo* par la méthode « Patient Derived Explant » (PDE)

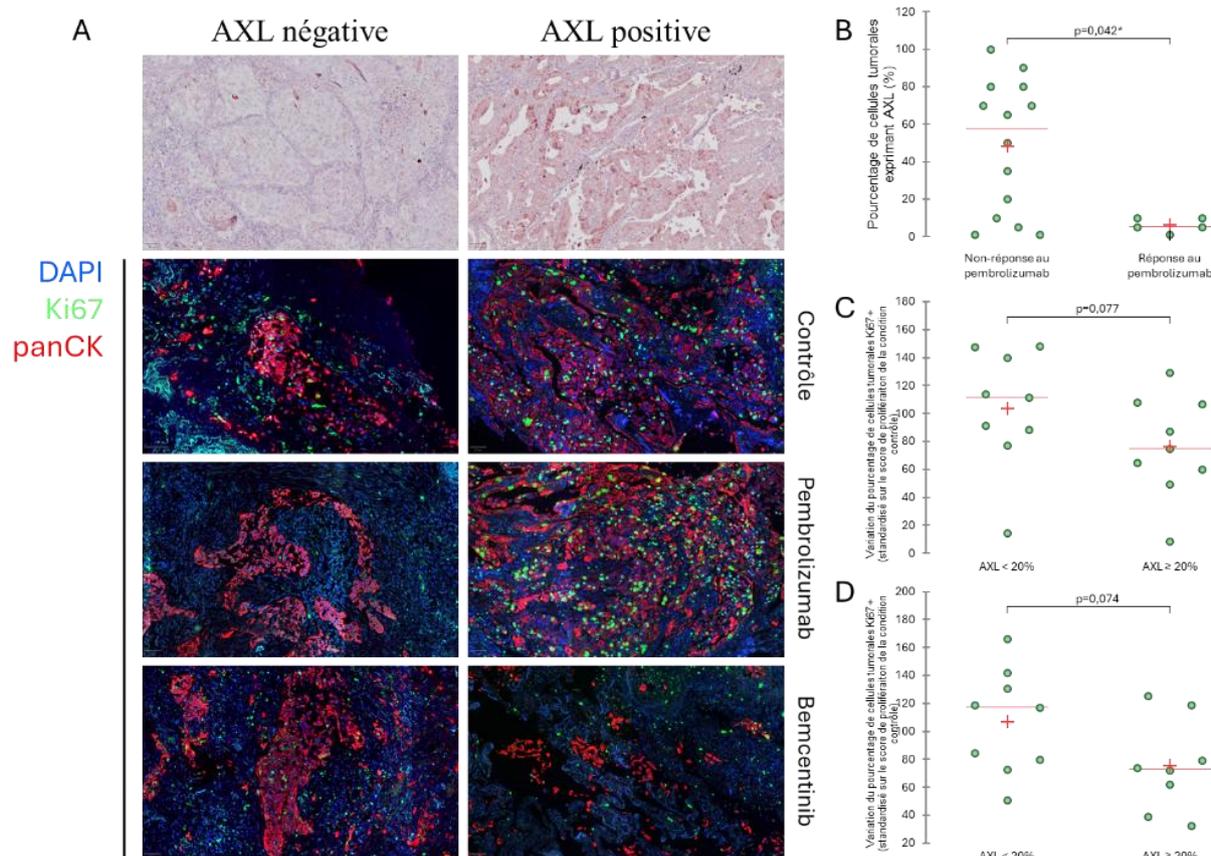
Nous avons réalisé la méthode de culture de « *Patient Derived Explant* » (PDE) sur 20 tumeurs. Ces cultures de fragments de tissus ont été traitées pendant 3 jours avec les drogues suivantes : Condition contrôle, Pembrolizumab, Bemcentinib, Ds1205b et les combinaisons Pembrolizumab + Bemcentinib et Pembrolizumab + Ds1205b. Les caractéristiques des tumeurs intégrées dans cette analyse sont représentées dans le tableau 4.

	No. (%) ou médiane [interquartile]
Age	68 [61-75]
Sexe (F/M)	9/11
PD-L1 (TPS, %)	2 [0-10]
Vimentine (TPS, %)	42 [8-65]
AXL (TPS, %)	20 [5-70]
Sous-type histologique	
Adénocarcinome	14 (70 %)
Carcinome épidermoïde	5 (25 %)
Autres (pléomorphe)	1 (5 %)
Degré de différenciation	
Bien différencié	4 (20 %)
Moyennement différencié	8 (40 %)
Peu différencié	8 (40 %)
Stade *	
Stade I	11 (55 %)
Stade II	4 (20 %)
Stade III	4 (20 %)
Stade IV	1 (5 %)

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1, TPS: tumor proportion score. Les données sont exprimées en médiane (écart-type) ou effectif (pourcentage). \* Selon la 8ème édition de la classification TNM du cancer pulmonaire.

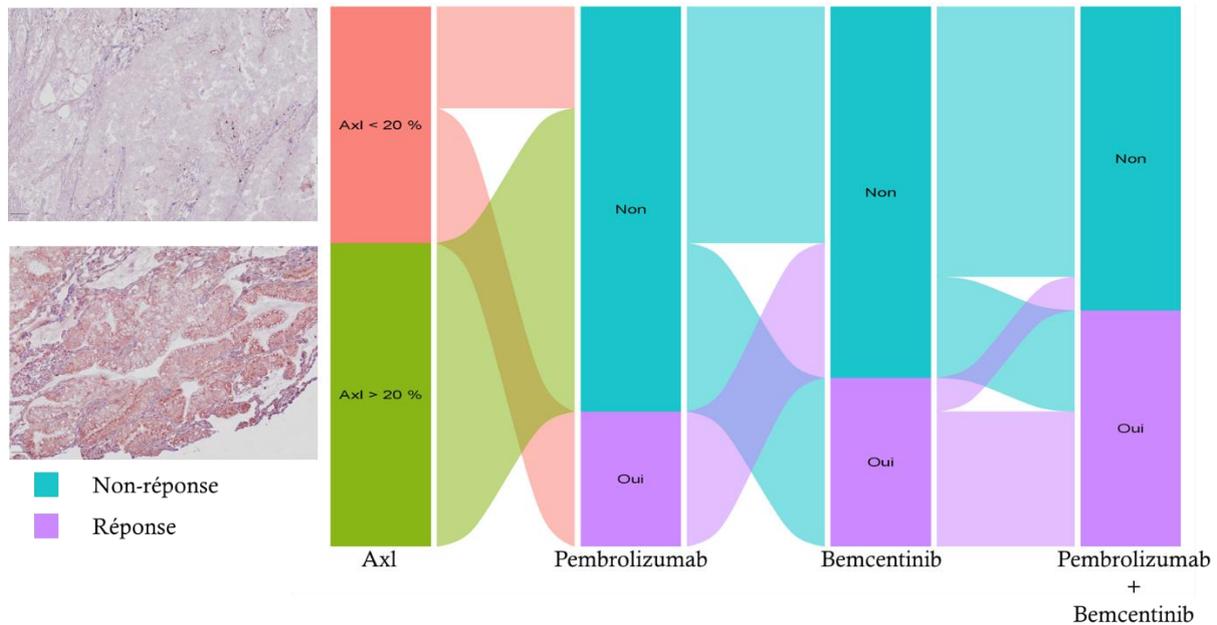
**Tableau 4 :** Caractéristiques principales des 20 CBNPC inclus dans le modèle de culture « *PDE* »

Nous avons quantifié la prolifération (évaluée par le Ki67) couplée à un double marquage pan-cytokératines (marquant les cellules épithéliales) en immunofluorescence. Cette méthode nous a ainsi permis de quantifier la part proliférative de cellules tumorales, rapporté dans la littérature comme témoin de réponse aux traitements antitumoraux (figure 37A). Nous avons par la suite considéré un seuil de réduction de 25% de cellules tumorales Ki67 positives pour définir un effet antitumoral. Il a ainsi été observé une expression significativement inférieure de AXL par les tumeurs en cas de réponse au Pembrolizumab ( $p < 0.05$ ; figure 37B). Nous avons ainsi observé 5 tumeurs témoignant d'une réponse au Pembrolizumab. Toutes ces tumeurs avaient une expression de AXL  $< 20\%$  ( $p < 0.05$ ). Ces associations n'étaient pas observées pour le PD-L1. Les tumeurs ont été classées comme ayant une forte ou faible expression d'AXL, en utilisant un seuil fixé à la médiane de 20 %. La comparaison des scores de prolifération tumorale (en comparaison avec la condition contrôle) montrait une diminution significative en cas d'exposition au Bemcentinib avec une réduction du score de prolifération tumorale en cas d'expression de AXL  $\geq 20\%$  ( $p < 0.05$ ; figure 37C) avec une tendance similaire pour le Ds1205b (figure 37D).



**Figure 37** : Evaluation de la réponse antitumorale sur modèle de culture par PDE. A. Illustration d'une tumeur AXL négative avec une réponse antitumorale sous Pembrolizumab et sans réponse sous Bemcentinib (panel de gauche) et tumeur AXL positive sans réponse antitumorale sous Pembrolizumab et répondant au Bemcentinib (panel de droite). B. Expression de AXL selon la réponse au Pembrolizumab défini par une réduction d'au moins 25% de la fraction tumorale en prolifération. C-D. Variation du pourcentage de cellules tumorales Ki67+ (standardisé sur le score de prolifération de la condition contrôlée) selon l'expression tumorale de AXL après traitement par Bemcentinib (C) ou Ds1205b (D).

Puis nous avons exploré l'interrelation entre l'expression tumorale de AXL et la réponse aux différentes drogues. 16 tumeurs comportaient une mesure réalisable de la fraction proliférative tumorale à la fois pour les conditions contrôle, Pembrolizumab, Bemcentinib et la combinaison Pembrolizumab + Bemcentinib. La totalité de ces tumeurs avec une expression de AXL  $\geq 20\%$  ne montraient pas de répondre au Pembrolizumab ( $n = 8$ ). Sur ces 8 tumeurs, 5 (62.5%) exhibaient une réponse au Bemcentinib. Enfin, 6 (75%) de ces mêmes tumeurs ne répondant pas au Pembrolizumab en monothérapie démontraient une réponse antitumorale après combinaison du Pembrolizumab au Bemcentinib. On notera que 2 tumeurs AXL-positives ne répondaient ni au Pembrolizumab ni au Bemcentinib en monothérapie mais ont démontré une réponse antitumorale en cas de combinaison. Inversement, 4 tumeurs avec une expression tumorale de AXL  $< 20\%$  ( $n = 8$ ) montraient une réponse à l'immunothérapie soit 50%. Aucune de ces mêmes tumeurs ne répondait au Bemcentinib. Enfin, la combinaison Pembrolizumab et Bemcentinib était associée à une réduction du nombre de tumeurs avec réponse antitumorale passant de 50 pour le Pembrolizumab en monothérapie à 12.5% ( $n = 1$ ) en combinaison (figure 38).



**Figure 38 :** Alluvial plot illustrant l'évolution de la réponse antitumorale selon les différentes conditions de traitement en fonction du niveau d'expression de AXL par la tumeur initiale.

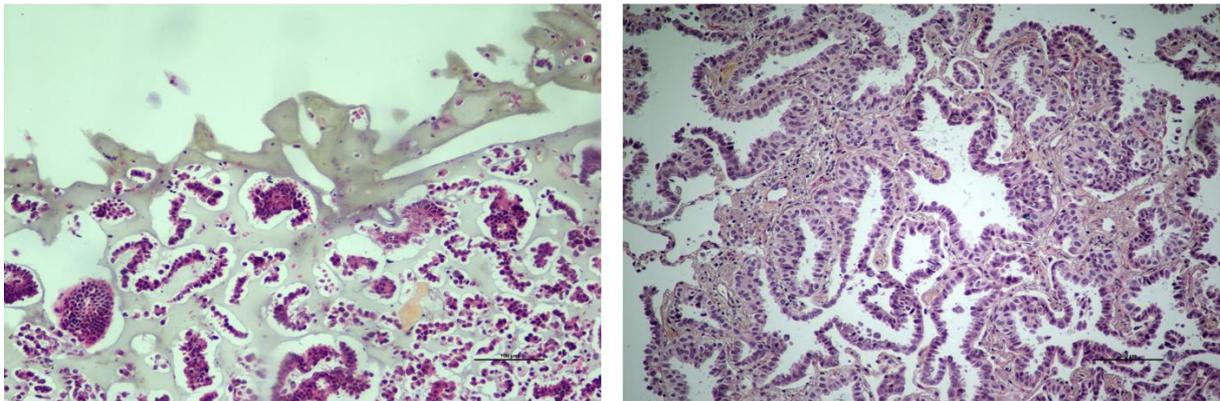
Enfin, au-delà de la simple présence des cellules immunitaires, leur fonctionnalité constitue un aspect crucial, rappelant l'importance de caractériser les profils lymphocytaires dits « épuisés » ou « anergiques ». Nous avons construit un Tissue MicroArray (TMA) de 54 tumeurs, incluant les 20 tumeurs préalablement traitées par la méthode PDE, en veillant à représenter de manière équitable les composantes tumorales et immunitaires. Les échantillons de ce TMA sont en cours d'analyse par transcriptomique spatiale, grâce à une collaboration avec la plateforme de l'IGBMC (Strasbourg). Cette approche permettra de mieux comprendre l'état fonctionnel des populations immunitaires au sein du microenvironnement tumoral, en lien avec l'expression d'AXL et les réponses immunitaires associées.

La culture par PDE semble ainsi offrir un modèle pertinent pour évaluer la réponse antitumorale à différentes thérapies, y compris l'immunothérapie, dans un environnement *ex vivo*. Cependant, ce modèle présente des limitations. En effet, il repose sur la présence de lymphocytes autologues résidant dans le tissu tumoral d'origine, ce qui restreint l'évaluation de la réponse immunitaire aux seules cellules présentes dans l'échantillon initial. De plus, il ne permet pas de contourner les phénomènes d'exclusion immunitaire, notamment dans leur dimension spatiale, un facteur clé dans la compréhension des interactions complexes entre cellules tumorales et immunitaires. Pour mieux évaluer la réponse immunitaire, l'utilisation d'un autre modèle de culture a été envisagé. Ce modèle consiste en la dissociation des fragments tissulaires et l'obtention de deux composantes cellulaires, les cellules tumorales d'une part et les cellules immunitaires d'autre part. Les deux culots recueillis sont alors réunis afin de constituer un modèle d'*ex-vivo organoid culture* (EVOC).

Nos premiers résultats montrent que cette technique de culture conserve à la fois les populations cellulaires tumorales et immunitaires (figure 39).

EVOC J0

Tumeur



**Figure 39 :** Illustration d'une coupe provenant d'un cytoblock à J0 après la méthode de dissociation du modèle EVOC (figure de gauche) et correspondance avec l'architecture de la tumeur initiale (figure de droite).

Cette méthode de culture semble prometteuse et nous poursuivons son développement, ambitionnant de pouvoir reconstituer en organoïde des cultures, afin d'étudier la réponse immunitaire antitumorale.

## **CONCLUSION GENERALE**

Notre étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le cancer du poumon non à petites cellules. Nous démontrons pour la première fois que l'expression tumorale de la protéine AXL est associée à une absence de bénéfice de l'immunothérapie par rapport à la chimiothérapie seule dans le traitement de première intention du CBNPC métastatique sans addiction oncogénique ciblable. L'expression d'AXL pourrait servir de biomarqueur pour identifier les patients susceptibles de bénéficier de l'ajout de l'immunothérapie à leur régime de traitement et pourrait également être une cible thérapeutique pour restaurer la sensibilité aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. Des études cliniques et biologiques supplémentaires sont nécessaires pour évaluer pleinement la pertinence clinique de ce biomarqueur, afin de permettre une meilleure sélection des patients et une prise en charge clinique optimale.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clinicians* **2024**, *74*, 229–263, doi:10.3322/caac.21834.
2. Schabath, M.B.; Cote, M.L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2019**, *28*, 1563–1579, doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
3. Nicholson, A.G.; Tsao, M.S.; Beasley, M.B.; Borczuk, A.C.; Brambilla, E.; Cooper, W.A.; Dacic, S.; Jain, D.; Kerr, K.M.; Lantuejoul, S.; et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* **2022**, *17*, 362–387, doi:10.1016/j.jtho.2021.11.003.
4. Megyesfalvi, Z.; Gay, C.M.; Popper, H.; Pirker, R.; Ostoros, G.; Heeke, S.; Lang, C.; Hoetzenecker, K.; Schwendenwein, A.; Boettiger, K.; et al. Clinical Insights into Small Cell Lung Cancer: Tumor Heterogeneity, Diagnosis, Therapy, and Future Directions. *CA Cancer J Clin* **2023**, *73*, 620–652, doi:10.3322/caac.21785.
5. Sucony, L.; Rassel, D.M.; Barker, A.P.; McCaughan, F.M.; Rintoul, R.C. Adenocarcinoma Spectrum Lesions of the Lung: Detection, Pathology and Treatment Strategies. *Cancer Treat Rev* **2021**, *99*, 102237, doi:10.1016/j.ctrv.2021.102237.
6. Lau, S.C.M.; Pan, Y.; Velcheti, V.; Wong, K.K. Squamous Cell Lung Cancer: Current Landscape and Future Therapeutic Options. *Cancer Cell* **2022**, *40*, 1279–1293, doi:10.1016/j.ccell.2022.09.018.
7. Andrini, E.; Marchese, P.V.; De Biase, D.; Mosconi, C.; Siepe, G.; Panzuto, F.; Ardizzoni, A.; Campana, D.; Lamberti, G. Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: Current Understanding and Challenges. *J Clin Med* **2022**, *11*, 1461, doi:10.3390/jcm11051461.
8. Li, C.; Lu, H. Adenosquamous Carcinoma of the Lung. *Onco Targets Ther* **2018**, *11*, 4829–4835, doi:10.2147/OTT.S164574.
9. Li, X.; Wu, D.; Liu, H.; Chen, J. Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma: Progress, Treatment and Expectations. *Ther Adv Med Oncol* **2020**, *12*, 1758835920950207, doi:10.1177/1758835920950207.
10. Huang, Y.; Guo, J.; Li, S.; Liu, J.; Xu, J.; Ye, W.; Zhang, L.; Dong, Z.; Wu, W.; Wu, C.; et al. The Correlation Between Histologic, Immunophenotypic, and Molecular Characteristics of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals That Sarcomatoid Change Is Potentially Derived From Epithelial Carcinoma Cells Undergoing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2023**, *31*, 17–25, doi:10.1097/PAI.0000000000001060.
11. Tan, A.C.; Tan, D.S.W. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol* **2022**, *40*, 611–625, doi:10.1200/JCO.21.01626.
12. Harada, G.; Yang, S.-R.; Cocco, E.; Drilon, A. Rare Molecular Subtypes of Lung Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2023**, *20*, 229–249, doi:10.1038/s41571-023-00733-6.

13. Wu, Y.-L.; Tsuboi, M.; He, J.; John, T.; Grohe, C.; Majem, M.; Goldman, J.W.; Laktionov, K.; Kim, S.-W.; Kato, T.; et al. Osimertinib in Resected *EGFR* -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 1711–1723, doi:10.1056/NEJMoa2027071.
14. Wu, Y.-L.; Dziadziuszko, R.; Ahn, J.S.; Barlesi, F.; Nishio, M.; Lee, D.H.; Lee, J.-S.; Zhong, W.; Horinouchi, H.; Mao, W.; et al. Alectinib in Resected *ALK* -Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2024**, *390*, 1265–1276, doi:10.1056/NEJMoa2310532.
15. Lu, S.; Kato, T.; Dong, X.; Ahn, M.-J.; Quang, L.-V.; Soparattanapaisarn, N.; Inoue, T.; Wang, C.-L.; Huang, M.; Yang, J.C.-H.; et al. Osimertinib after Chemoradiotherapy in Stage III *EGFR* -Mutated NSCLC. *N Engl J Med* **2024**, NEJMoa2402614, doi:10.1056/NEJMoa2402614.
16. Delahaye, C.; Figarol, S.; Pradines, A.; Favre, G.; Mazieres, J.; Calvayrac, O. Early Steps of Resistance to Targeted Therapies in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 2613, doi:10.3390/cancers14112613.
17. Di Federico, A.; De Giglio, A.; Parisi, C.; Gelsomino, F. STK11/LKB1 and KEAP1 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: Prognostic Rather than Predictive? *Eur J Cancer* **2021**, *157*, 108–113, doi:10.1016/j.ejca.2021.08.011.
18. Papillon-Cavanagh, S.; Doshi, P.; Dobrin, R.; Szustakowski, J.; Walsh, A.M. STK11 and KEAP1 Mutations as Prognostic Biomarkers in an Observational Real-World Lung Adenocarcinoma Cohort. *ESMO Open* **2020**, *5*, e000706, doi:10.1136/esmoopen-2020-000706.
19. Hendriks, L.E.; Kerr, K.M.; Menis, J.; Mok, T.S.; Nestle, U.; Passaro, A.; Peters, S.; Planchard, D.; Smit, E.F.; Solomon, B.J.; et al. Oncogene-Addicted Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol* **2023**, *34*, 339–357, doi:10.1016/j.annonc.2022.12.009.
20. Lim, T.K.H.; Skoulidis, F.; Kerr, K.M.; Ahn, M.-J.; Kapp, J.R.; Soares, F.A.; Yatabe, Y. KRAS G12C in Advanced NSCLC: Prevalence, Co-Mutations, and Testing. *Lung Cancer* **2023**, *184*, 107293, doi:10.1016/j.lungcan.2023.107293.
21. Kimbrough, E.O.; Marin-Acevedo, J.A.; Drusbosky, L.M.; Mooradian, A.; Zhao, Y.; Manochakian, R.; Lou, Y. Sex- and Age-Associated Differences in Genomic Alterations among Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancers* **2024**, *16*, 2366, doi:10.3390/cancers16132366.
22. Fois, S.S.; Paliogiannis, P.; Zinellu, A.; Fois, A.G.; Cossu, A.; Palmieri, G. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 612, doi:10.3390/ijms22020612.
23. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W.E.E.; Nicholson, A.G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V.; et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **2016**, *11*, 39–51, doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009.
24. Riely, G.J.; Wood, D.E.; Ettinger, D.S.; Aisner, D.L.; Akerley, W.; Bauman, J.R.; Bharat, A.; Bruno, D.S.; Chang, J.Y.; Chirieac, L.R.; et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version

4.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **2024**, *22*, 249–274, doi:10.6004/jnccn.2204.0023.

25. Mazieres, J.; Drilon, A.; Lusque, A.; Mhanna, L.; Cortot, A.B.; Mezquita, L.; Thai, A.A.; Masciaux, C.; Couraud, S.; Veillon, R.; et al. Immune Checkpoint Inhibitors for Patients with Advanced Lung Cancer and Oncogenic Driver Alterations: Results from the IMMUNOTARGET Registry. *Ann Oncol* **2019**, *30*, 1321–1328, doi:10.1093/annonc/mdz167.

26. Sun, Q.; Hong, Z.; Zhang, C.; Wang, L.; Han, Z.; Ma, D. Immune Checkpoint Therapy for Solid Tumours: Clinical Dilemmas and Future Trends. *Sig Transduct Target Ther* **2023**, *8*, 320, doi:10.1038/s41392-023-01522-4.

27. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csőszi, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1823–1833, doi:10.1056/NEJMoa1606774.

28. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csőszi, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *JCO* **2019**, *37*, 537–546, doi:10.1200/JCO.18.00149.

29. Herbst, R.S.; Giaccone, G.; de Marinis, F.; Reinmuth, N.; Vergnenegre, A.; Barrios, C.H.; Morise, M.; Felip, E.; Andric, Z.; Geater, S.; et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* **2020**, *383*, 1328–1339, doi:10.1056/NEJMoa1917346.

30. Özgüroğlu, M.; Kilickap, S.; Sezer, A.; Gümüş, M.; Bondarenko, I.; Gogishvili, M.; Nechaeva, M.; Schenker, M.; Cicin, I.; Ho, G.F.; et al. First-Line Cemiplimab Monotherapy and Continued Cemiplimab beyond Progression plus Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with PD-L1 50% or More (EMPOWER-Lung 1): 35-Month Follow-up from a Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology* **2023**, *24*, 989–1001, doi:10.1016/S1470-2045(23)00329-7.

31. Novello, S.; Kowalski, D.M.; Luft, A.; Gümüş, M.; Vicente, D.; Mazières, J.; Rodríguez-Cid, J.; Tafreshi, A.; Cheng, Y.; Lee, K.H.; et al. Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Update of the Phase III KEYNOTE-407 Study. *JCO* **2023**, *41*, 1999–2006, doi:10.1200/JCO.22.01990.

32. Garassino, M.C.; Gadgeel, S.; Speranza, G.; Felip, E.; Esteban, E.; Dómine, M.; Hochmair, M.J.; Powell, S.F.; Bischoff, H.G.; Peled, N.; et al. Pembrolizumab Plus Pemetrexed and Platinum in Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Outcomes From the Phase 3 KEYNOTE-189 Study. *JCO* **2023**, *41*, 1992–1998, doi:10.1200/JCO.22.01989.

33. Jotte, R.; Cappuzzo, F.; Vynnychenko, I.; Stroyakovskiy, D.; Rodríguez-Abreu, D.; Hussein, M.; Soo, R.; Conter, H.J.; Kozuki, T.; Huang, K.-C.; et al. Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. *Journal of Thoracic Oncology* **2020**, *15*, 1351–1360, doi:10.1016/j.jtho.2020.03.028.

34. Nishio, M.; Barlesi, F.; West, H.; Ball, S.; Bordoni, R.; Cobo, M.; Longeras, P.D.; Goldschmidt, J.; Novello, S.; Orlandi, F.; et al. Atezolizumab Plus Chemotherapy for First-Line Treatment of Nonsquamous NSCLC: Results From the Randomized Phase 3 IMpower132 Trial. *J Thorac Oncol* **2021**, *16*, 653–664, doi:10.1016/j.jtho.2020.11.025.
35. Yang, Y.; Sun, J.; Wang, Z.; Fang, J.; Yu, Q.; Han, B.; Cang, S.; Chen, G.; Mei, X.; Yang, Z.; et al. Updated Overall Survival Data and Predictive Biomarkers of Sintilimab Plus Pemetrexed and Platinum as First-Line Treatment for Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous NSCLC in the Phase 3 ORIENT-11 Study. *Journal of Thoracic Oncology* **2021**, *16*, 2109–2120, doi:10.1016/j.jtho.2021.07.015.
36. Zhou, C.; Wu, L.; Fan, Y.; Wang, Z.; Liu, L.; Chen, G.; Zhang, L.; Huang, D.; Cang, S.; Yang, Z.; et al. Sintilimab Plus Platinum and Gemcitabine as First-Line Treatment for Advanced or Metastatic Squamous NSCLC: Results From a Randomized, Double-Blind, Phase 3 Trial (ORIENT-12). *Journal of Thoracic Oncology* **2021**, *16*, 1501–1511, doi:10.1016/j.jtho.2021.04.011.
37. Spigel, D.R.; Faivre-Finn, C.; Gray, J.E.; Vicente, D.; Planchard, D.; Paz-Ares, L.; Vansteenkiste, J.F.; Garassino, M.C.; Hui, R.; Quantin, X.; et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **2022**, *40*, 1301–1311, doi:10.1200/JCO.21.01308.
38. Filippi, A.R.; Bar, J.; Chouaid, C.; Christoph, D.C.; Field, J.K.; Fietkau, R.; Garassino, M.C.; Garrido, P.; Haakensen, V.D.; Kao, S.; et al. Real-World Outcomes with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Patients with Unresectable Stage III NSCLC: Interim Analysis of Overall Survival from PACIFIC-R. *ESMO Open* **2024**, *9*, 103464, doi:10.1016/j.esmoop.2024.103464.
39. Forde, P.M.; Spicer, J.; Lu, S.; Provencio, M.; Mitsudomi, T.; Awad, M.M.; Felip, E.; Broderick, S.R.; Brahmer, J.R.; Swanson, S.J.; et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med* **2022**, NEJMoa2202170, doi:10.1056/NEJMoa2202170.
40. Spicer, J.; Girard, N.; Provencio, M.; Wang, C.; Mitsudomi, T.; Awad, M.M.; Vokes, E.E.; Taube, J.M.; Lupinacci, L.; Saylor, G.B.; et al. Neoadjuvant Nivolumab (NIVO) + Chemotherapy (Chemo) vs Chemo in Patients (Pts) with Resectable NSCLC: 4-Year Update from CheckMate 816. *JCO* **2024**, *42*, LBA8010–LBA8010, doi:10.1200/JCO.2024.42.17\_suppl.LBA8010.
41. Sezer, A.; Kilickap, S.; Gümüş, M.; Bondarenko, I.; Özgüroğlu, M.; Gogishvili, M.; Turk, H.M.; Cicin, I.; Bentsion, D.; Gladkov, O.; et al. Cemiplimab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with PD-L1 of at Least 50%: A Multicentre, Open-Label, Global, Phase 3, Randomised, Controlled Trial. *The Lancet* **2021**, *397*, 592–604, doi:10.1016/S0140-6736(21)00228-2.
42. Kilickap, S.; Sezer, A.; Gümüş, M.; Bondarenko, I.; Özgüroğlu, M.; Gogishvili, M.; Turk, H.M.; Cicin, I.; Bentsion, D.; Gladkov, O.; et al. OA01.03 Clinical Benefits of First-Line (1L) Cemiplimab Monotherapy by PD-L1 Expression Levels in Patients With Advanced NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* **2021**, *16*, S101, doi:10.1016/j.jtho.2021.01.272.

43. Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **2013**, *39*, 1–10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
44. Mellman, I.; Chen, D.S.; Powles, T.; Turley, S.J. The Cancer-Immunity Cycle: Indication, Genotype, and Immunotype. *Immunity* **2023**, *56*, 2188–2205, doi:10.1016/j.immuni.2023.09.011.
45. Kornepati, A.V.R.; Vadlamudi, R.K.; Curiel, T.J. Programmed Death Ligand 1 Signals in Cancer Cells. *Nat Rev Cancer* **2022**, *22*, 174–189, doi:10.1038/s41568-021-00431-4.
46. Kleffel, S.; Posch, C.; Barthel, S.R.; Mueller, H.; Schlapbach, C.; Guenova, E.; Elco, C.P.; Lee, N.; Juneja, V.R.; Zhan, Q.; et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* **2015**, *162*, 1242–1256, doi:10.1016/j.cell.2015.08.052.
47. Wang, S.; Hu, P.; Fan, J.; Zou, J.; Hong, W.; Huang, X.; Pan, D.; Chen, H.; Zhu, Y.Z.; Ye, L. CD80-Fc Fusion Protein as a Potential Cancer Immunotherapy Strategy. *Antib Ther* **2024**, *7*, 28–36, doi:10.1093/abt/tbad029.
48. Li, S.; Sampson, C.; Liu, C.; Piao, H.; Liu, H.-X. Integrin Signaling in Cancer: Bidirectional Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cell Commun Signal* **2023**, *21*, 266, doi:10.1186/s12964-023-01264-4.
49. Gato-Cañas, M.; Zuazo, M.; Arasanz, H.; Ibañez-Vea, M.; Lorenzo, L.; Fernandez-Hinojal, G.; Vera, R.; Smerdou, C.; Martisova, E.; Arozarena, I.; et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep* **2017**, *20*, 1818–1829, doi:10.1016/j.celrep.2017.07.075.
50. Du, W.; Zhu, J.; Zeng, Y.; Liu, T.; Zhang, Y.; Cai, T.; Fu, Y.; Zhang, W.; Zhang, R.; Liu, Z.; et al. KPNB1-Mediated Nuclear Translocation of PD-L1 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation via the Gas6/MerTK Signaling Pathway. *Cell Death Differ* **2021**, *28*, 1284–1300, doi:10.1038/s41418-020-00651-5.
51. Azuma, T.; Yao, S.; Zhu, G.; Flies, A.S.; Flies, S.J.; Chen, L. B7-H1 Is a Ubiquitous Antiapoptotic Receptor on Cancer Cells. *Blood* **2008**, *111*, 3635–3643, doi:10.1182/blood-2007-11-123141.
52. Lau, J.; Cheung, J.; Navarro, A.; Lianoglou, S.; Haley, B.; Totpal, K.; Sanders, L.; Koeppen, H.; Caplazi, P.; McBride, J.; et al. Tumour and Host Cell PD-L1 Is Required to Mediate Suppression of Anti-Tumour Immunity in Mice. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14572, doi:10.1038/ncomms14572.
53. Tu, X.; Qin, B.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Kahila, M.; Newsheer, S.; Yin, P.; Yuan, J.; Pei, H.; Li, H.; et al. PD-L1 (B7-H1) Competes with the RNA Exosome to Regulate the DNA Damage Response and Can Be Targeted to Sensitize to Radiation or Chemotherapy. *Mol Cell* **2019**, *74*, 1215–1226.e4, doi:10.1016/j.molcel.2019.04.005.
54. Jardim, D.L.; Goodman, A.; De Melo Gagliato, D.; Kurzrock, R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 154–173, doi:10.1016/j.ccell.2020.10.001.
55. Yarchoan, M.; Hopkins, A.; Jaffee, E.M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* **2017**, *377*, 2500–2501, doi:10.1056/NEJMc1713444.

56. Muquith, M.; Espinoza, M.; Elliott, A.; Xiu, J.; Seeber, A.; El-Deiry, W.; Antonarakis, E.S.; Graff, S.L.; Hall, M.J.; Borghaei, H.; et al. Tissue-Specific Thresholds of Mutation Burden Associated with Anti-PD-1/L1 Therapy Benefit and Prognosis in Microsatellite-Stable Cancers. *Nat Cancer* **2024**, doi:10.1038/s43018-024-00752-x.
57. Galvano, A.; Gristina, V.; Malapelle, U.; Pisapia, P.; Pepe, F.; Barraco, N.; Castiglia, M.; Perez, A.; Rolfo, C.; Troncione, G.; et al. The Prognostic Impact of Tumor Mutational Burden (TMB) in the First-Line Management of Advanced Non-Oncogene Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100124, doi:10.1016/j.esmoop.2021.100124.
58. Chen, B.; Li, H.; Liu, C.; Xiang, X.; Wang, S.; Wu, A.; Shen, Y.; Li, G. Prognostic Value of the Common Tumour-Infiltrating Lymphocyte Subtypes for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* **2020**, *15*, e0242173, doi:10.1371/journal.pone.0242173.
59. Hegde, P.S.; Chen, D.S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* **2020**, *52*, 17–35, doi:10.1016/j.immuni.2019.12.011.
60. Vidotto, T.; Melo, C.M.; Castelli, E.; Koti, M.; Dos Reis, R.B.; Squire, J.A. Emerging Role of PTEN Loss in Evasion of the Immune Response to Tumours. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 1732–1743, doi:10.1038/s41416-020-0834-6.
61. Peng, W.; Chen, J.Q.; Liu, C.; Malu, S.; Creasy, C.; Tetzlaff, M.T.; Xu, C.; McKenzie, J.A.; Zhang, C.; Liang, X.; et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov* **2016**, *6*, 202–216, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0283.
62. Ivashkiv, L.B. IFN $\gamma$ : Signalling, Epigenetics and Roles in Immunity, Metabolism, Disease and Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18*, 545–558, doi:10.1038/s41577-018-0029-z.
63. Mazet, J.M.; Mahale, J.N.; Tong, O.; Watson, R.A.; Lechuga-Vieco, A.V.; Pirgova, G.; Lau, V.W.C.; Attar, M.; Koneva, L.A.; Sansom, S.N.; et al. IFN $\gamma$  Signaling in Cytotoxic T Cells Restricts Anti-Tumor Responses by Inhibiting the Maintenance and Diversity of Intra-Tumoral Stem-like T Cells. *Nat Commun* **2023**, *14*, 321, doi:10.1038/s41467-023-35948-9.
64. Jones, P.A.; Ohtani, H.; Chakravarthy, A.; De Carvalho, D.D. Epigenetic Therapy in Immune-Oncology. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19*, 151–161, doi:10.1038/s41568-019-0109-9.
65. Micevic, G.; Bosenberg, M.W.; Yan, Q. The Crossroads of Cancer Epigenetics and Immune Checkpoint Therapy. *Clin Cancer Res* **2023**, *29*, 1173–1182, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-0784.
66. Boyero, L.; Sánchez-Gastaldo, A.; Alonso, M.; Noguera-Uclés, J.F.; Molina-Pinelo, S.; Bernabé-Caro, R. Primary and Acquired Resistance to Immunotherapy in Lung Cancer: Unveiling the Mechanisms Underlying of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, E3729, doi:10.3390/cancers12123729.
67. Memon, D.; Schoenfeld, A.J.; Ye, D.; Fromm, G.; Rizvi, H.; Zhang, X.; Keddar, M.R.; Mathew, D.; Yoo, K.J.; Qiu, J.; et al. Clinical and Molecular Features of Acquired Resistance to Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* **2024**, S1535610823004415, doi:10.1016/j.ccell.2023.12.013.

68. Hiltbrunner, S.; Cords, L.; Kasser, S.; Freiburger, S.N.; Kreutzer, S.; Toussaint, N.C.; Grob, L.; Opitz, I.; Messerli, M.; Zoche, M.; et al. Acquired Resistance to Anti-PD1 Therapy in Patients with NSCLC Associates with Immunosuppressive T Cell Phenotype. *Nat Commun* **2023**, *14*, 5154, doi:10.1038/s41467-023-40745-5.
69. Chow, A.; Perica, K.; Klebanoff, C.A.; Wolchok, J.D. Clinical Implications of T Cell Exhaustion for Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2022**, *19*, 775–790, doi:10.1038/s41571-022-00689-z.
70. Baldominos, P.; Barbera-Mourelle, A.; Barreiro, O.; Huang, Y.; Wight, A.; Cho, J.-W.; Zhao, X.; Estivill, G.; Adam, I.; Sanchez, X.; et al. Quiescent Cancer Cells Resist T Cell Attack by Forming an Immunosuppressive Niche. *Cell* **2022**, *185*, 1694-1708.e19, doi:10.1016/j.cell.2022.03.033.
71. Dolina, J.S.; Van Braeckel-Budimir, N.; Thomas, G.D.; Salek-Ardakani, S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol* **2021**, *12*, 715234, doi:10.3389/fimmu.2021.715234.
72. Wherry, E.J.; Kurachi, M. Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion. *Nat Rev Immunol* **2015**, *15*, 486–499, doi:10.1038/nri3862.
73. Ricciuti, B.; Lamberti, G.; Puchala, S.R.; Mahadevan, N.R.; Lin, J.-R.; Alessi, J.V.; Chowdhury, A.; Li, Y.Y.; Wang, X.; Spurr, L.; et al. Genomic and Immunophenotypic Landscape of Acquired Resistance to PD-(L)1 Blockade in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO* **2024**, *42*, 1311–1321, doi:10.1200/JCO.23.00580.
74. Martinez-Usatorre, A.; Kadioglu, E.; Boivin, G.; Cianciaruso, C.; Guichard, A.; Torchia, B.; Zangger, N.; Nassiri, S.; Keklikoglou, I.; Schmittnaegel, M.; et al. Overcoming Microenvironmental Resistance to PD-1 Blockade in Genetically Engineered Lung Cancer Models. *Sci Transl Med* **2021**, *13*, eabd1616, doi:10.1126/scitranslmed.abd1616.
75. Fujiwara, Y.; Mitra, A.; Naqash, A.R.; Takebe, N. A Review of Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors and Potential Strategies for Therapy. *Cancer Drug Resist* **2020**, *3*, 252–275, doi:10.20517/cdr.2020.11.
76. Yang, J.; Antin, P.; Berx, G.; Blanpain, C.; Brabletz, T.; Bronner, M.; Campbell, K.; Cano, A.; Casanova, J.; Christofori, G.; et al. Guidelines and Definitions for Research on Epithelial-Mesenchymal Transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, doi:10.1038/s41580-020-0237-9.
77. Greenburg, G.; Hay, E.D. Epithelia Suspended in Collagen Gels Can Lose Polarity and Express Characteristics of Migrating Mesenchymal Cells. *J Cell Biol* **1982**, *95*, 333–339, doi:10.1083/jcb.95.1.333.
78. Pei, D.; Shu, X.; Gassama-Diagne, A.; Thiery, J.P. Mesenchymal–Epithelial Transition in Development and Reprogramming. *Nat Cell Biol* **2019**, *21*, 44–53, doi:10.1038/s41556-018-0195-z.
79. Yao, W.; Wang, Z.; Ma, H.; Lin, Y.; Liu, X.; Li, P.; He, X. Epithelial-Mesenchymal Plasticity (EMP) in Wound Healing: Exploring EMT Mechanisms, Regulatory Network, and Therapeutic Opportunities. *Heliyon* **2024**, e34269, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e34269.

80. Dongre, A.; Weinberg, R.A. New Insights into the Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Implications for Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 69–84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
81. Mortezaee, K.; Majidpoor, J.; Kharazinejad, E. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stemness and Heterogeneity: Updated. *Med Oncol* **2022**, *39*, 193, doi:10.1007/s12032-022-01801-0.
82. To, K.K.W.; Cho, W.C.S. Mesenchymal Epithelial Transition (MET): A Key Player in Chemotherapy Resistance and an Emerging Target for Potentiating Cancer Immunotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **2022**, *22*, 269–285, doi:10.2174/1568009622666220307105107.
83. Jie, X.-X.; Zhang, X.-Y.; Xu, C.-J. Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Circulating Tumor Cells and Cancer Metastasis: Mechanisms and Clinical Applications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81558–81571, doi:10.18632/oncotarget.18277.
84. Stemmler, M.P.; Eccles, R.L.; Brabletz, S.; Brabletz, T. Non-Redundant Functions of EMT Transcription Factors. *Nat Cell Biol* **2019**, *21*, 102–112, doi:10.1038/s41556-018-0196-y.
85. Usman, S.; Waseem, N.H.; Nguyen, T.K.N.; Mohsin, S.; Jamal, A.; Teh, M.-T.; Waseem, A. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers* **2021**, *13*, 4985, doi:10.3390/cancers13194985.
86. Dauphin, M.; Barbe, C.; Lemaire, S.; Nawrocki-Raby, B.; Lagonotte, E.; Delepine, G.; Birembaut, P.; Gilles, C.; Polette, M. Vimentin Expression Predicts the Occurrence of Metastases in Non Small Cell Lung Carcinomas. *Lung Cancer* **2013**, *81*, 117–122, doi:10.1016/j.lungcan.2013.03.011.
87. Strouhalova, K.; Přečková, M.; Gandalovičová, A.; Brábek, J.; Gregor, M.; Rosel, D. Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 184, doi:10.3390/cancers12010184.
88. DeRyckere, D.; Huelse, J.M.; Earp, H.S.; Graham, D.K. TAM Family Kinases as Therapeutic Targets at the Interface of Cancer and Immunity. *Nat Rev Clin Oncol* **2023**, *20*, 755–779, doi:10.1038/s41571-023-00813-7.
89. Zhu, C.; Wei, Y.; Wei, X. AXL Receptor Tyrosine Kinase as a Promising Anti-Cancer Approach: Functions, Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 153, doi:10.1186/s12943-019-1090-3.
90. Miao, Y.R.; Rankin, E.B.; Giaccia, A.J. Therapeutic Targeting of the Functionally Elusive TAM Receptor Family. *Nat Rev Drug Discov* **2024**, *23*, 201–217, doi:10.1038/s41573-023-00846-8.
91. Rankin, E.B.; Giaccia, A.J. The Receptor Tyrosine Kinase AXL in Cancer Progression. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*, 103, doi:10.3390/cancers8110103.
92. Pinato, D.J.; Mauri, F.A.; Lloyd, T.; Vaira, V.; Casadio, C.; Boldorini, R.L.; Sharma, R. The Expression of Axl Receptor Tyrosine Kinase Influences the Tumour Phenotype and Clinical Outcome of Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Br J Cancer* **2013**, *108*, 621–628, doi:10.1038/bjc.2013.9.

93. Shieh, Y.-S.; Lai, C.-Y.; Kao, Y.-R.; Shiah, S.-G.; Chu, Y.-W.; Lee, H.-S.; Wu, C.-W. Expression of Axl in Lung Adenocarcinoma and Correlation with Tumor Progression. *Neoplasia* **2005**, *7*, 1058–1064, doi:10.1593/neo.05640.
94. Ishikawa, M.; Sonobe, M.; Nakayama, E.; Kobayashi, M.; Kikuchi, R.; Kitamura, J.; Imamura, N.; Date, H. Higher Expression of Receptor Tyrosine Kinase Axl, and Differential Expression of Its Ligand, Gas6, Predict Poor Survival in Lung Adenocarcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* **2013**, *20 Suppl 3*, S467-476, doi:10.1245/s10434-012-2795-3.
95. Zhang, Z.; Lee, J.C.; Lin, L.; Olivas, V.; Au, V.; LaFramboise, T.; Abdel-Rahman, M.; Wang, X.; Levine, A.D.; Rho, J.K.; et al. Activation of the AXL Kinase Causes Resistance to EGFR-Targeted Therapy in Lung Cancer. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 852–860, doi:10.1038/ng.2330.
96. Taniguchi, H.; Yamada, T.; Wang, R.; Tanimura, K.; Adachi, Y.; Nishiyama, A.; Tanimoto, A.; Takeuchi, S.; Araujo, L.H.; Boroni, M.; et al. AXL Confers Intrinsic Resistance to Osimertinib and Advances the Emergence of Tolerant Cells. *Nat Commun* **2019**, *10*, 259, doi:10.1038/s41467-018-08074-0.
97. Gay, C.M.; Balaji, K.; Byers, L.A. Giving AXL the Axe: Targeting AXL in Human Malignancy. *Br J Cancer* **2017**, *116*, 415–423, doi:10.1038/bjc.2016.428.
98. Asiedu, M.K.; Beauchamp-Perez, F.D.; Ingle, J.N.; Behrens, M.D.; Radisky, D.C.; Knutson, K.L. AXL Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Regulates the Function of Breast Cancer Stem Cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1316–1324, doi:10.1038/onc.2013.57.
99. Ying, X.; Chen, J.; Huang, X.; Huang, P.; Yan, S. Effect of AXL on the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Exp Ther Med* **2017**, *14*, 785–790, doi:10.3892/etm.2017.4532.
100. Ancel, J.; Birembaut, P.; Dewolf, M.; Durlach, A.; Nawrocki-Raby, B.; Dalstein, V.; Delepine, G.; Blacher, S.; Deslée, G.; Gilles, C.; et al. Programmed Death-Ligand 1 and Vimentin: A Tandem Marker as Prognostic Factor in NSCLC. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11101411.
101. Malagoli Tagliazucchi, G.; Wiecek, A.J.; Withnell, E.; Secrier, M. Genomic and Microenvironmental Heterogeneity Shaping Epithelial-to-Mesenchymal Trajectories in Cancer. *Nat Commun* **2023**, *14*, 789, doi:10.1038/s41467-023-36439-7.
102. Kudo-Saito, C.; Shirako, H.; Takeuchi, T.; Kawakami, Y. Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 195–206, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.023.
103. Ricciardi, M.; Zanotto, M.; Malpeli, G.; Bassi, G.; Perbellini, O.; Chilosi, M.; Bifari, F.; Krampera, M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Induced by Inflammatory Priming Elicits Mesenchymal Stromal Cell-like Immune-Modulatory Properties in Cancer Cells. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 1067–1075, doi:10.1038/bjc.2015.29.
104. Shen, S.; Liu, X.; Guo, Q.; Liang, Q.; Wu, J.; Guan, G.; Zou, C.; Zhu, C.; Yan, Z.; Liu, T.; et al. Tumor Microenvironment Remodeling plus Immunotherapy Could Be Used in Mesenchymal-like Tumor with High Tumor Residual and Drug Resistant Rate. *Commun Biol* **2023**, *6*, 1281, doi:10.1038/s42003-023-05667-4.

105. Nixon, B.G.; Gao, S.; Wang, X.; Li, M.O. TGF $\beta$  Control of Immune Responses in Cancer: A Holistic Immuno-Oncology Perspective. *Nat Rev Immunol* **2023**, *23*, 346–362, doi:10.1038/s41577-022-00796-z.
106. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel III, E.E.; Koeppen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGF $\beta$  Attenuates Tumour Response to PD-L1 Blockade by Contributing to Exclusion of T Cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548, doi:10.1038/nature25501.
107. Tauriello, D.V.F.; Sancho, E.; Batlle, E. Overcoming TGF $\beta$ -Mediated Immune Evasion in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2022**, *22*, 25–44, doi:10.1038/s41568-021-00413-6.
108. Kudo-Saito, C.; Shirako, H.; Ohike, M.; Tsukamoto, N.; Kawakami, Y. CCL2 Is Critical for Immunosuppression to Promote Cancer Metastasis. *Clin Exp Metastasis* **2013**, *30*, 393–405, doi:10.1007/s10585-012-9545-6.
109. Hsu, D.S.-S.; Wang, H.-J.; Tai, S.-K.; Chou, C.-H.; Hsieh, C.-H.; Chiu, P.-H.; Chen, N.-J.; Yang, M.-H. Acetylation of Snail Modulates the Cytokinome of Cancer Cells to Enhance the Recruitment of Macrophages. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 534–548, doi:10.1016/j.ccell.2014.09.002.
110. Debnath, J.; Gammoh, N.; Ryan, K.M. Autophagy and Autophagy-Related Pathways in Cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2023**, *24*, 560–575, doi:10.1038/s41580-023-00585-z.
111. Lee, J.H.; Shklovskaya, E.; Lim, S.Y.; Carlino, M.S.; Menzies, A.M.; Stewart, A.; Pedersen, B.; Irvine, M.; Alavi, S.; Yang, J.Y.H.; et al. Transcriptional Downregulation of MHC Class I and Melanoma De-Differentiation in Resistance to PD-1 Inhibition. *Nat Commun* **2020**, *11*, 1897, doi:10.1038/s41467-020-15726-7.
112. Terry, S.; Abdou, A.; Engelsens, A.S.T.; Buart, S.; Dessen, P.; Corgnac, S.; Collares, D.; Meurice, G.; Gausdal, G.; Baud, V.; et al. AXL Targeting Overcomes Human Lung Cancer Cell Resistance to NK- and CTL-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Immunol Res* **2019**, *7*, 1789–1802, doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0903.
113. Guo, Z.; Li, Y.; Zhang, D.; Ma, J. Axl Inhibition Induces the Antitumor Immune Response Which Can Be Further Potentiated by PD-1 Blockade in the Mouse Cancer Models. *Oncotarget* **2017**, *8*, 89761–89774, doi:10.18632/oncotarget.21125.
114. Li, H.; Liu, Z.; Liu, L.; Zhang, H.; Han, C.; Girard, L.; Park, H.; Zhang, A.; Dong, C.; Ye, J.; et al. AXL Targeting Restores PD-1 Blockade Sensitivity of STK11/LKB1 Mutant NSCLC through Expansion of TCF1+ CD8 T Cells. *Cell Reports Medicine* **2022**, *3*, 100554, doi:10.1016/j.xcrm.2022.100554.
115. Terry, S.; Dalban, C.; Rioux-Leclercq, N.; Adam, J.; Meylan, M.; Buart, S.; Bougoüin, A.; Lespagnol, A.; Dugay, F.; Moreno, I.C.; et al. Association of AXL and PD-L1 Expression with Clinical Outcomes in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma Treated with PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* **2021**, *27*, 6749–6760, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0972.
116. Lahiri, A.; Maji, A.; Potdar, P.D.; Singh, N.; Parikh, P.; Bisht, B.; Mukherjee, A.; Paul, M.K. Lung Cancer Immunotherapy: Progress, Pitfalls, and Promises. *Mol Cancer* **2023**, *22*, 40, doi:10.1186/s12943-023-01740-y.

117. Sholl, L.M. Biomarkers of Response to Checkpoint Inhibitors beyond PD-L1 in Lung Cancer. *Mod Pathol* **2022**, *35*, 66–74, doi:10.1038/s41379-021-00932-5.
118. Wakelee, H.; Liberman, M.; Kato, T.; Tsuboi, M.; Lee, S.-H.; Gao, S.; Chen, K.-N.; Doms, C.; Majem, M.; Eigendorff, E.; et al. Perioperative Pembrolizumab for Early-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2023**, *389*, 491–503, doi:10.1056/NEJMoa2302983.
119. Heymach, J.V.; Harpole, D.; Mitsudomi, T.; Taube, J.M.; Galffy, G.; Hochmair, M.; Winder, T.; Zukov, R.; Garbaos, G.; Gao, S.; et al. Perioperative Durvalumab for Resectable Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2023**, *389*, 1672–1684, doi:10.1056/NEJMoa2304875.
120. Cameron, R.B.; Hines, J.B.; Torri, V.; Porcu, L.; Donington, J.; Bestvina, C.M.; Vokes, E.; Dolezal, J.M.; Esposito, A.; Garassino, M.C. What Is the Ideal Endpoint in Early-Stage Immunotherapy Neoadjuvant Trials in Lung Cancer? *Ther Adv Med Oncol* **2023**, *15*, 17588359231198446, doi:10.1177/17588359231198446.
121. Grant, M.J.; Herbst, R.S.; Goldberg, S.B. Selecting the Optimal Immunotherapy Regimen in Driver-Negative Metastatic NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* **2021**, *18*, 625–644, doi:10.1038/s41571-021-00520-1.
122. Santamaria, P.G.; Moreno-Bueno, G.; Portillo, F.; Cano, A. EMT: Present and Future in Clinical Oncology. *Mol Oncol* **2017**, *11*, 718–738, doi:10.1002/1878-0261.12091.
123. Zhang, Y.; Weinberg, R.A. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer: Complexity and Opportunities. *Front Med* **2018**, *12*, 361–373, doi:10.1007/s11684-018-0656-6.
124. Bruni, S.; Mercogliano, M.F.; Mauro, F.L.; Cordo Russo, R.I.; Schillaci, R. Cancer Immune Exclusion: Breaking the Barricade for a Successful Immunotherapy. *Front Oncol* **2023**, *13*, 1135456, doi:10.3389/fonc.2023.1135456.
125. Vu, T.; Datta, P.K. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, 171, doi:10.3390/cancers9120171.
126. Park, M.; Kim, D.; Ko, S.; Kim, A.; Mo, K.; Yoon, H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 6806, doi:10.3390/ijms23126806.
127. Odero-Marrah, V.; Hawsawi, O.; Henderson, V.; Sweeney, J. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1095*, 101–110, doi:10.1007/978-3-319-95693-0\_6.
128. De Matteis, S.; Canale, M.; Verlicchi, A.; Bronte, G.; Delmonte, A.; Crinò, L.; Martinelli, G.; Ulivi, P. Advances in Molecular Mechanisms and Immunotherapy Involving the Immune Cell-Promoted Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer. *J Oncol* **2019**, *2019*, 7475364, doi:10.1155/2019/7475364.
129. Genna, A.; Vanwynsberghe, A.M.; Villard, A.V.; Pottier, C.; Ancel, J.; Polette, M.; Gilles, C. EMT-Associated Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: Sticky Friends on the Road to Metastasis. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12061632.

130. Satelli, A.; Li, S. Vimentin in Cancer and Its Potential as a Molecular Target for Cancer Therapy. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 3033–3046, doi:10.1007/s00018-011-0735-1.
131. Zaman, A.; Bivona, T.G. Targeting AXL in NSCLC. *Lung Cancer (Auckl)* **2021**, *12*, 67–79, doi:10.2147/LCTT.S305484.
132. Zhao, C.; Tu, S.; Zhang, F.; Zhang, X. Expression Characteristics of AXL and YAP in Non-Small Cell Lung Cancer and Prognostic Importance. *Int J Clin Exp Pathol* **2018**, *11*, 3357–3365.
133. Son, H.-Y.; Jeong, H.-K. Immune Evasion Mechanism and AXL. *Front Oncol* **2021**, *11*, 756225, doi:10.3389/fonc.2021.756225.
134. Sang, Y.B.; Kim, J.-H.; Kim, C.-G.; Hong, M.H.; Kim, H.R.; Cho, B.C.; Lim, S.M. The Development of AXL Inhibitors in Lung Cancer: Recent Progress and Challenges. *Front Oncol* **2022**, *12*, 811247, doi:10.3389/fonc.2022.811247.
135. Chang, J.T.-H.; Lee, Y.M.; Huang, R.S. 23091115. *Transl Res* **2015**, *166*, 568–585, doi:10.1016/j.trsl.2015.08.001.
136. Bhattacharya, S.; Dunn, P.; Thomas, C.G.; Smith, B.; Schaefer, H.; Chen, J.; Hu, Z.; Zalocusky, K.A.; Shankar, R.D.; Shen-Orr, S.S.; et al. ImmPort, toward Repurposing of Open Access Immunological Assay Data for Translational and Clinical Research. *Sci Data* **2018**, *5*, 180015, doi:10.1038/sdata.2018.15.
137. Thompson, J.C.; Hwang, W.-T.; Davis, C.; Deshpande, C.; Jeffries, S.; Rajpurohit, Y.; Krishna, V.; Smirnov, D.; Verona, R.; Lorenzi, M.V.; et al. Gene Signatures of Tumor Inflammation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Predict Responses to Immune Checkpoint Blockade in Lung Cancer with High Accuracy. *Lung Cancer* **2020**, *139*, 1–8, doi:10.1016/j.lungcan.2019.10.012.
138. De Giglio, A.; Di Federico, A.; Nuvola, G.; Deiana, C.; Gelsomino, F. The Landscape of Immunotherapy in Advanced NSCLC: Driving Beyond PD-1/PD-L1 Inhibitors (CTLA-4, LAG3, IDO, OX40, TIGIT, Vaccines). *Curr Oncol Rep* **2021**, *23*, 126, doi:10.1007/s11912-021-01124-9.
139. Griss, J.; Viteri, G.; Sidiropoulos, K.; Nguyen, V.; Fabregat, A.; Hermjakob, H. ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. *Mol Cell Proteomics* **2020**, *19*, 2115–2125, doi:10.1074/mcp.TIR120.002155.
140. Hugo, W.; Zaretsky, J.M.; Sun, L.; Song, C.; Moreno, B.H.; Hu-Lieskovan, S.; Berent-Maoz, B.; Pang, J.; Chmielowski, B.; Cherry, G.; et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **2016**, *165*, 35–44, doi:10.1016/j.cell.2016.02.065.
141. Chi, H.; Peng, G.; Yang, J.; Zhang, J.; Song, G.; Xie, X.; Strohmer, D.F.; Lai, G.; Zhao, S.; Wang, R.; et al. Machine Learning to Construct Sphingolipid Metabolism Genes Signature to Characterize the Immune Landscape and Prognosis of Patients with Uveal Melanoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2022**, *13*, 1056310, doi:10.3389/fendo.2022.1056310.
142. Koopmans, F.; van Nierop, P.; Andres-Alonso, M.; Byrnes, A.; Cijssouw, T.; Coba, M.P.; Cornelisse, L.N.; Farrell, R.J.; Goldschmidt, H.L.; Howrigan, D.P.; et al. SynGO: An Evidence-

Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron* **2019**, *103*, 217-234.e4, doi:10.1016/j.neuron.2019.05.002.

143. Ayers, M.; Lunceford, J.; Nebozhyn, M.; Murphy, E.; Loboda, A.; Kaufman, D.R.; Albright, A.; Cheng, J.D.; Kang, S.P.; Shankaran, V.; et al. IFN- $\gamma$ -Related mRNA Profile Predicts Clinical Response to PD-1 Blockade. *J Clin Invest* **2017**, *127*, 2930–2940, doi:10.1172/JCI91190.

144. Byers, L.A.; Diao, L.; Wang, J.; Saintigny, P.; Girard, L.; Peyton, M.; Shen, L.; Fan, Y.; Giri, U.; Tumula, P.K.; et al. 25214461. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 279–290, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1558.

145. Mak, M.P.; Tong, P.; Diao, L.; Cardnell, R.J.; Gibbons, D.L.; William, W.N.; Skoulidis, F.; Parra, E.R.; Rodriguez-Canales, J.; Wistuba, I.I.; et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 609–620, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0876.

146. Chae, Y.K.; Chang, S.; Ko, T.; Anker, J.; Agte, S.; Iams, W.; Choi, W.M.; Lee, K.; Cruz, M. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Signature Is Inversely Associated with T-Cell Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Sci Rep* **2018**, *8*, 2918, doi:10.1038/s41598-018-21061-1.

147. Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. 34453261. *Sci Signal* **2013**, *6*, p11, doi:10.1126/scisignal.2004088.

148. Meng, G.; Liu, X.; Ma, T.; Lv, D.; Sun, G. Predictive Value of Tumor Mutational Burden for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2022**, *17*, e0263629, doi:10.1371/journal.pone.0263629.

149. Yoshimura, A.; Yamada, T.; Serizawa, M.; Uehara, H.; Tanimura, K.; Okuma, Y.; Fukuda, A.; Watanabe, S.; Nishioka, N.; Takeda, T.; et al. High Levels of AXL Expression in Untreated EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Negatively Impacts the Use of Osimertinib. *Cancer Sci* **2023**, *114*, 606–618, doi:10.1111/cas.15608.

150. Denize, T.; Hou, Y.; Pignon, J.-C.; Walton, E.; West, D.J.; Freeman, G.J.; Braun, D.A.; Wu, C.J.; Gupta, S.; Motzer, R.J.; et al. Transcriptomic Correlates of Tumor Cell PD-L1 Expression and Response to Nivolumab Monotherapy in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **2022**, *28*, 4045–4055, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-0923.

151. Gibbons, D.L.; Creighton, C.J. Pan-Cancer Survey of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers across the Cancer Genome Atlas. *Dev. Dyn.* **2018**, *247*, 555–564, doi:10.1002/dvdy.24485.

152. Ancel, J.; Dormoy, V.; Raby, B.N.; Dalstein, V.; Durlach, A.; Dewolf, M.; Gilles, C.; Polette, M.; Deslée, G. Soluble Biomarkers to Predict Clinical Outcomes in Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Immune Checkpoints Inhibitors. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1171649, doi:10.3389/fimmu.2023.1171649.

153. Dominguez, C.; David, J.M.; Palena, C. Epithelial-Mesenchymal Transition and Inflammation at the Site of the Primary Tumor. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *47*, 177–184, doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.002.
154. Wang, L.; Saci, A.; Szabo, P.M.; Chasalow, S.D.; Castillo-Martin, M.; Domingo-Domenech, J.; Siefker-Radtke, A.; Sharma, P.; Sfakianos, J.P.; Gong, Y.; et al. EMT- and Stroma-Related Gene Expression and Resistance to PD-1 Blockade in Urothelial Cancer. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3503, doi:10.1038/s41467-018-05992-x.
155. Lou, Y.; Diao, L.; Cuentas, E.R.P.; Denning, W.L.; Chen, L.; Fan, Y.H.; Byers, L.A.; Wang, J.; Papadimitrakopoulou, V.A.; Behrens, C.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Is Associated with a Distinct Tumor Microenvironment Including Elevation of Inflammatory Signals and Multiple Immune Checkpoints in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3630–3642, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1434.
156. Hendriks, L.E.; Kerr, K.M.; Menis, J.; Mok, T.S.; Nestle, U.; Passaro, A.; Peters, S.; Planchard, D.; Smit, E.F.; Solomon, B.J.; et al. Non-Oncogene-Addicted Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology* **2023**, *34*, 358–376, doi:10.1016/j.annonc.2022.12.013.
157. Bodor, J.N.; Bumber, Y.; Borghaei, H. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancer* **2020**, *126*, 260–270, doi:10.1002/cncr.32468.
158. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 1627–1639, doi:10.1056/NEJMoa1507643.
159. Borghaei, H.; Gettinger, S.; Vokes, E.E.; Chow, L.Q.M.; Burgio, M.A.; de Castro Carpeno, J.; Pluzanski, A.; Arrieta, O.; Frontera, O.A.; Chiari, R.; et al. Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **2021**, *39*, 723–733, doi:10.1200/JCO.20.01605.
160. Ancel, J.; Dewolf, M.; Deslée, G.; Nawrocky-Raby, B.; Dalstein, V.; Gilles, C.; Polette, M. Clinical Impact of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer as a Biomarker Assisting in Therapeutic Decisions. *Cells Tissues Organs* **2020**, 1–19, doi:10.1159/000510103.
161. Engelsens, A.S.T.; Lotsberg, M.L.; Abou Khouzam, R.; Thiery, J.-P.; Lorens, J.B.; Chouaib, S.; Terry, S. Dissecting the Role of AXL in Cancer Immune Escape and Resistance to Immune Checkpoint Inhibition. *Front Immunol* **2022**, *13*, 869676, doi:10.3389/fimmu.2022.869676.
162. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clinicians* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
163. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New Response Evaluation Criteria in

Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1). *European Journal of Cancer* **2009**, *45*, 228–247, doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026.

164. Macleod, K.; Mullen, P.; Sewell, J.; Rabiasz, G.; Lawrie, S.; Miller, E.; Smyth, J.F.; Langdon, S.P. Altered ErbB Receptor Signaling and Gene Expression in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer. *Cancer Research* **2005**, *65*, 6789–6800, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2684.

165. Wilson, C.; Ye, X.; Pham, T.; Lin, E.; Chan, S.; McNamara, E.; Neve, R.M.; Belmont, L.; Koeppen, H.; Yauch, R.L.; et al. AXL Inhibition Sensitizes Mesenchymal Cancer Cells to Antimitotic Drugs. *Cancer Research* **2014**, *74*, 5878–5890, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1009.

166. Tang, Y.; Zang, H.; Wen, Q.; Fan, S. AXL in Cancer: A Modulator of Drug Resistance and Therapeutic Target. *J Exp Clin Cancer Res* **2023**, *42*, 148, doi:10.1186/s13046-023-02726-w.

167. Kim, H.R.; Kim, W.S.; Choi, Y.J.; Choi, C.M.; Rho, J.K.; Lee, J.C. Epithelial-Mesenchymal Transition Leads to Crizotinib Resistance in H2228 Lung Cancer Cells with EML4-ALK Translocation. *Mol Oncol* **2013**, *7*, 1093–1102, doi:10.1016/j.molonc.2013.08.001.

168. Nakamichi, S.; Seike, M.; Miyanaga, A.; Chiba, M.; Zou, F.; Takahashi, A.; Ishikawa, A.; Kunugi, S.; Noro, R.; Kubota, K.; et al. Overcoming Drug-Tolerant Cancer Cell Subpopulations Showing AXL Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition Is Critical in Conquering ALK-Positive Lung Cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 27242–27255, doi:10.18632/oncotarget.25531.

169. Balaji, K.; Vijayaraghavan, S.; Diao, L.; Tong, P.; Fan, Y.; Carey, J.P.W.; Bui, T.N.; Warner, S.; Heymach, J.V.; Hunt, K.K.; et al. AXL Inhibition Suppresses the DNA Damage Response and Sensitizes Cells to PARP Inhibition in Multiple Cancers. *Molecular Cancer Research* **2017**, *15*, 45–58, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0157.

170. Ye, X.; Li, Y.; Stawicki, S.; Couto, S.; Eastham-Anderson, J.; Kallop, D.; Weimer, R.; Wu, Y.; Pei, L. An Anti-Axl Monoclonal Antibody Attenuates Xenograft Tumor Growth and Enhances the Effect of Multiple Anticancer Therapies. *Oncogene* **2010**, *29*, 5254–5264, doi:10.1038/onc.2010.268.

171. Rothlin, C.V.; Carrera-Silva, E.A.; Bosurgi, L.; Ghosh, S. TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. *Annu Rev Immunol* **2015**, *33*, 355–391, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112103.

172. Zhai, X.; Pu, D.; Wang, R.; Zhang, J.; Lin, Y.; Wang, Y.; Zhai, N.; Peng, X.; Zhou, Q.; Li, L. Gas6/AXL Pathway: Immunological Landscape and Therapeutic Potential. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1121130, doi:10.3389/fonc.2023.1121130.

173. Shire, N.J.; Klein, A.B.; Golozar, A.; Collins, J.M.; Fraeman, K.H.; Nordstrom, B.L.; McEwen, R.; Hembrough, T.; Rizvi, N.A. STK11 (LKB1) Mutations in Metastatic NSCLC: Prognostic Value in the Real World. *PLoS One* **2020**, *15*, e0238358, doi:10.1371/journal.pone.0238358.

174. Felip, E.; Brunsvig, P.; Vinolas, N.; Ponce Aix, S.; Carcereny Costa, E.; Dómine Gomez, M.; Trigo Perez, J.M.; Arriola, E.; Campelo, R.G.; Spicer, J.F.; et al. A Phase II Study of Bemcentinib (BGB324), a First-in-Class Highly Selective AXL Inhibitor, with Pembrolizumab in Pts with Advanced NSCLC: OS for Stage I and Preliminary Stage II Efficacy. *JCO* **2019**, *37*, 9098–9098, doi:10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.9098.
175. Han, M.-L.; Zhao, Y.-F.; Tan, C.-H.; Xiong, Y.-J.; Wang, W.-J.; Wu, F.; Fei, Y.; Wang, L.; Liang, Z.-Q. Cathepsin L Upregulation-Induced EMT Phenotype Is Associated with the Acquisition of Cisplatin or Paclitaxel Resistance in A549 Cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 1606–1622, doi:10.1038/aps.2016.93.
176. Suda, K.; Rozeboom, L.; Rivard, C.J.; Yu, H.; Ellison, K.; Melnick, M.A.C.; Hinz, T.K.; Chan, D.; Heasley, L.E.; Politi, K.; et al. Therapy-Induced E-Cadherin Downregulation Alters Expression of Programmed Death Ligand-1 in Lung Cancer Cells. *Lung Cancer* **2017**, *109*, 1–8, doi:10.1016/j.lungcan.2017.04.010.
177. van Staalduinen, J.; Baker, D.; Ten Dijke, P.; van Dam, H. Epithelial-Mesenchymal-Transition-Inducing Transcription Factors: New Targets for Tackling Chemoresistance in Cancer? *Oncogene* **2018**, *37*, 6195–6211, doi:10.1038/s41388-018-0378-x.
178. Fischer, K.R.; Durrans, A.; Lee, S.; Sheng, J.; Li, F.; Wong, S.T.C.; Choi, H.; El Rayes, T.; Ryu, S.; Troeger, J.; et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Not Required for Lung Metastasis but Contributes to Chemoresistance. *Nature* **2015**, *527*, 472–476, doi:10.1038/nature15748.
179. Toge, M.; Yokoyama, S.; Kato, S.; Sakurai, H.; Senda, K.; Doki, Y.; Hayakawa, Y.; Yoshimura, N.; Saiki, I. Critical Contribution of MCL-1 in EMT-Associated Chemo-Resistance in A549 Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1844–1848, doi:10.3892/ijco.2015.2861.
180. Jiang, G.-B.; Fang, H.-Y.; Tao, D.-Y.; Chen, X.-P.; Cao, F.-L. COX-2 Potentiates Cisplatin Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Promoting EMT in an AKT Signaling Pathway-Dependent Manner. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2019**, *23*, 3838–3846, doi:10.26355/eurrev\_201905\_17811.
181. Chen, Q.-Y.; Jiao, D.-M.; Wang, J.; Hu, H.; Tang, X.; Chen, J.; Mou, H.; Lu, W. miR-206 Regulates Cisplatin Resistance and EMT in Human Lung Adenocarcinoma Cells Partly by Targeting MET. *Oncotarget* **2016**, *7*, 24510–24526, doi:10.18632/oncotarget.8229.
182. He, Y.; Xie, H.; Yu, P.; Jiang, S.; Wei, L. FOXC2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Cisplatin Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 1049–1059, doi:10.1007/s00280-018-3697-2.
183. Shen, W.; Pang, H.; Liu, J.; Zhou, J.; Zhang, F.; Liu, L.; Ma, N.; Zhang, N.; Zhang, H.; Liu, L. Epithelial-Mesenchymal Transition Contributes to Docetaxel Resistance in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol. Res.* **2014**, *22*, 47–55, doi:10.3727/096504014X14098532393473.
184. Chen, D.; Huang, J.; Zhang, K.; Pan, B.; Chen, J.; De, W.; Wang, R.; Chen, L. MicroRNA-451 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Docetaxel-Resistant Lung

- Adenocarcinoma Cells by Targeting Proto-Oncogene c-Myc. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 3050–3067, doi:10.1016/j.ejca.2014.09.008.
185. Tan, T.Z.; Miow, Q.H.; Miki, Y.; Noda, T.; Mori, S.; Huang, R.Y.-J.; Thiery, J.P. Epithelial-Mesenchymal Transition Spectrum Quantification and Its Efficacy in Deciphering Survival and Drug Responses of Cancer Patients. *EMBO Mol Med* **2014**, *6*, 1279–1293, doi:10.15252/emmm.201404208.
186. Gröger, C.J.; Grubinger, M.; Waldhör, T.; Vierlinger, K.; Mikulits, W. Meta-Analysis of Gene Expression Signatures Defining the Epithelial to Mesenchymal Transition during Cancer Progression. *PLoS One* **2012**, *7*, e51136, doi:10.1371/journal.pone.0051136.
187. Zhao, M.; Kong, L.; Liu, Y.; Qu, H. dbEMT: An Epithelial-Mesenchymal Transition Associated Gene Resource. *Sci Rep* **2015**, *5*, 11459, doi:10.1038/srep11459.
188. Zhou, Q.; Pan, Y.; Yang, X.; Zhao, Y.; Han, G.; Pang, Q.; Zhang, Z.; Wang, Q.; Yao, J.; Wang, H.; et al. Neoadjuvant SHR-1701 with or without Chemotherapy in Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: A Proof-of-Concept, Phase 2 Trial. *Cancer Cell* **2024**, S1535610824001922, doi:10.1016/j.ccell.2024.05.024.
189. Burstyn-Cohen, T.; Fresia, R. TAM Receptors in Phagocytosis: Beyond the Mere Internalization of Particles. *Immunological Reviews* **2023**, *319*, 7–26, doi:10.1111/imr.13267.
190. Wium, M.; Pაცეც, J.D.; Zerbini, L.F. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: An Overview. *Cells* **2018**, *7*, 166, doi:10.3390/cells7100166.
191. Li, F.; Xu, L.; Li, C.; Hu, F.; Su, Y. Immunological Role of Gas6/TAM Signaling in Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Res* **2024**, *238*, 161–171, doi:10.1016/j.thromres.2024.05.002.

---

## **Biomarqueurs prédictifs de résistance primaire et secondaire aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules de stade avancé**

L'immunothérapie (IO) a transformé le traitement du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), notamment grâce au marqueur PD-L1. Cependant, l'efficacité de l'IO reste incertaine, avec des résistances primaires ou acquises. La recherche de marqueurs prédictifs de réponse à l'IO est cruciale. Dans le CBNPC, notre équipe a démontré une corrélation entre PD-L1 et la vimentine, associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Nous faisons l'hypothèse que la résistance des CBNPC aux anti-PD(L)1 est liée à une polarisation mésenchymateuse.

L'inhibition de la TEM en clinique étant difficile, il est essentiel d'identifier des cibles associées à la TEM avec un potentiel thérapeutique, notamment le récepteur à tyrosine kinase AXL. L'objectif est d'identifier les mécanismes de résistance à l'IO dans le CBNPC, avec un focus sur la TEM et AXL.

Les approches combinent des analyses bioinformatiques et des cultures innovantes de tumeurs primaires. Ces méthodes ont confirmé l'intérêt d'AXL comme marqueur de résistance à l'IO. L'étude des mécanismes d'échappement à l'IO inclut la quantification des contingents cellulaires immunitaires du microenvironnement tumoral. AXL a été validé comme marqueur prédictif de réponse à l'IO dans une cohorte rétrospective de patients CBNPC en première ligne métastatique.

Ce projet, encadré par une cohorte rétrospective (MR004160420221) de patients CBNPC du CHU de Reims et par la CRB (banque n° AC-2019-340), valide AXL comme biomarqueur prédictif de la réponse à l'IO. L'étude d'AXL pourrait permettre de mieux identifier les patients bénéficiant de l'IO pour un CBNPC et d'envisager l'inhibition d'AXL pour prévenir ou lever une résistance à l'IO.

Mots-clés : Poumon, Cancer, Immunothérapie et Cancer, Marqueurs biologiques tumoraux, Transition épithélio-mésenchymateuse.

---

## **Predictive Biomarkers of Primary and Secondary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer**

---

Immunotherapy (IO) has transformed the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), particularly through biomarkers like PD-L1. However, IO's efficacy remains uncertain, with cases of primary or acquired resistance. Identifying predictive markers for IO response is crucial. In NSCLC, our team demonstrated a correlation between PD-L1 and vimentin, associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). We hypothesize that NSCLC resistance to anti-PD(L)1 is linked to mesenchymal polarization. Given the challenges of inhibiting EMT clinically, identifying therapeutic targets associated with EMT, particularly the receptor tyrosine kinase AXL, is essential. Our objective is to identify resistance mechanisms to IO in NSCLC, focusing on EMT and AXL.

The approaches used combined bioinformatic analyses and innovative primary tumor cultures. These methods confirmed AXL's interest as a marker of IO resistance. The study of immune escape mechanisms includes quantifying immune cell contingents in the tumor microenvironment. AXL's validation as a predictive biomarker for IO response was conducted in a retrospective clinical cohort of patients treated with first-line metastatic IO.

This project, overseen by a retrospective cohort (MR004160420221) of NSCLC patients at CHU de Reims under the supervision of doctoral candidate Julien Ancel, utilizes material provided by the CRB (bank no. AC-2019-340).

This work validates AXL as a predictive biomarker for IO response and a potential therapeutic target. Studying AXL could better identify patients benefiting from IO for NSCLC and consider AXL inhibition to prevent or overcome IO resistance.

Keywords : Lung cancer, Immunotherapy, Epithelial-Mesenchymal transition, Biomarker.

---

**Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

---

**Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

---

**Université de Reims Champagne-Ardenne**

**Unité Inserm UMR-S1250**

**Pathologie Pulmonaire et Plasticité Cellulaire (P3Cell)**

45 rue Cognacq-Jay, CHU Maison-Blanche,

51092 Reims Cedex

