Regards croisés de l'anatomopathologiste et du pneumologue

The different perspectives of the anatomo-pathologist and pneumologist

Sylvie Lantuejoul[1,2]
Éric Dansin[3]

[1] Centre de lutte contre le cancer Unicancer Léon Bérard
Département de biopathologie
Département de recherche translationnelle et d'innovations
28, rue Laënnec
69008 Lyon
France
<sylvie.lantuejoul@lyon.unicancer.fr>

[2] Université Grenoble Alpes
INSERM U1209/CNRS 5309
Institute for Advanced Biosciences
38700 La Tronche
France

[3] Centre Oscar Lambret
3, rue Frédéric Combemale
BP 307 - 59020 Lille Cedex
France
<e-Dansin@o-lambret.fr>

Remerciements et autres mentions :

Liens d'intérêts : SL : activité de conseil pour Bristol Myers Squibb, MSD, Astra Zeneca, Roche.

ED : participation aux groupes d'experts des laboratoires MSD, BMS, Roche. Honoraires pour conférences des laboratoires MSD, Astra-Zeneca, BMS.

RÉSUMÉ

Les immunothérapies offrent de nouvelles perspectives pour les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé, notamment en gain de survie et en taux de réponse plus élevés, et avec une toxicité moindre que la chimiothérapie conventionnelle. La prescription d'inhibiteurs de PD-1, comme le nivolumab et le pembrolizumab, et/ou d'inhibiteurs de PD-L1, comme l'atézolizumab, a été approuvée par les autorités de santé pour ces patients, et pour le nivolumab et l'atézolizumab, quel que soit le niveau d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Pour le pembrolizumab, un minimum de 50 % de cellules tumorales positives est requis pour le traitement en première ligne et de 1 % pour la deuxième ligne et au-delà. Les pathologistes sont donc impliqués au quotidien dans la sélection des patients potentiellement répondeurs à ces immunothérapies. Ils utilisent soit les tests standardisés ou kits sur automates dédiés soit des protocoles dits « maisons ». Cet article reprend les grandes lignes de l'immunohistochimie PD-L1 et détaille les points critiques de son implantation et de son interprétation.

● Mots clés : carcinome non à petites cellules ; cancer ; PD-L1 ; immunothérapie ; immunohistochimie.

ABSTRACT

Immunotherapy is a promising new treatment option for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), offering improved survival and response rates with less severe toxicity than conventional chemotherapy. PD-1 inhibitors, such as nivolumab and pembrolizumab, and/or PD-L1 inhibitors, such as atezolizumab, have been approved by regulatory authorities for the treatment of advanced NSCLC. Nivolumab and atezolizumab are approved for patients regardless of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression, however, the prescription of pembrolizumab for advanced stages of NSCLC should depend on PD-L1 expression by tumour cells, based on immunohistochemistry (a minimum of 50% positive tumour cells are required for first-line treatments, and 1% for second-line and beyond). Pathologists use standardized PD-L1 assays, based on dedicated platforms or laboratory-developed tests, to routinely select patients who are potentially good responders to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapies. This article provides a detailed review of PD-L1 immunohistochemistry, including its predictive value and key points regarding its use and interpretation.

● *Key words: advanced non-small cell lung cancer; cancer; PD-L1; immunotherapy; immunohistochemistry.*

Tirés à part : S. Lantuejoul

Pour citer cet article : Lantuejoul S, Dansin É. Regards croisés de l'anatomopathologiste et du pneumologue. *Innov Ther Oncol* 2018 ; 4 : 197-204. doi : 10.1684/ito.2018.0129

doi: 10.1684/ito.2018.0129

Les résultats thérapeutiques de l'immunothérapie s'illustrent non seulement par une tolérance globale le plus souvent très favorable et significativement meilleure à celle de la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle, mais surtout par des résultats en termes de survie sans progression et de survie globale. Ce palmarès favorable et ô combien enthousiasmant de l'immunothérapie se trouve cependant marqué par trois écueils non négligeables. Premièrement des toxicités spécifiques, certes rares mais possiblement gravissimes (cutanées, pulmonaires, digestives, etc.) ou délétères (endocriniennes, etc.), peuvent survenir de façon imprévisible et s'avérer difficiles à gérer. Deuxièmement, l'absence de biomarqueurs prédictifs robustes (expression de PD-L1, lymphocytes infiltrant les tumeurs [TILs], charge mutationnelle, etc.) et la divergence sur les critères de positivité (scores, seuils, techniques, etc.) rendent la sélection des candidats à l'immunothérapie encore imparfaite et discutée. Troisièmement, les coûts de l'immunothérapie peuvent représenter un obstacle à la prise en charge, selon le système de soins par la collectivité et, *a fortiori*, par les patients, avec au final un frein à l'accès à ces traitements innovants. Les réponses à certaines de ces questions se trouvent, au moins en partie, dans les projets de recherche clinique (essais stratégiques académiques, etc.), les collaborations entre cliniciens, anatomopathologistes et biologistes (évaluations biocliniques, etc.) et les industriels du médicament (élaboration de normes communes, identification de biomarqueurs, etc.).

Expression de PD-L1

PD-L1, le ligand de PD-1 (*programmed death protein 1*) est exprimé dans un certain nombre de tissus normaux, dont les tissus lymphoïdes, et par les fibroblastes, les macrophages, les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales (bronchiolaires) et endothéliales. Dans les tumeurs pulmonaires, dans environ 10 % des cas, l'expression de PD-L1 est dite constitutive (résistance immune innée), liée à une stimulation oncogénique (mutations de *EGFR* et de *KRAS*, réarrangement du gène *ALK*, perte d'expression de *PTEN* et activation de la voie PI3K/MAPK) [1-3]. Dans les adénocarcinomes pulmonaires, l'expression de PD-L1 serait plus volontiers corrélée à la présence de mutations de *KRAS*, au tabagisme et au sous-type histologique d'adénocarcinome solide [4]. On sait également, depuis les travaux de Rivzi *et al.* [5], que les tumeurs à forte charge mutationnelle (mutations non synonymes), plus propices au développement de néo-antigènes stimulant l'immunité médiée par les lymphocytes T, surexprimeraient PD-L1 et seraient de meilleures candidates aux inhibiteurs des *checkpoints* de l'immunité PD-1/PD-L1.

L'expression de PD-L1 peut aussi être inductible. Cette expression est dite adaptative (résistance immune adaptative), en relation soit avec la production d'interféron γ (et autres interférons et cytokines) par les cellules immunitaires du stroma et à l'activation de PD-1, soit à une amplification de PD-L1, à la présence de micro-ARN *up*-régulés (mir-20b, mir-21, mir-130b) ou *down*-régulés (mir-200, mir-197) [6-8], en réaction à l'hypoxie ou encore liés au profil EMT (*epithelial mesenchymal transition*) des tumeurs [6, 9-12]. L'expression de PD-L1 semble surtout corrélée à la présence de TILs CD8 ou PD-1+, de Treg, de cellules de Treg FOXP3+, ou de cellules présentatrices d'antigènes IDO+ au sein du stroma tumoral. On distingue ainsi les tumeurs inflammatoires (ou *hot*), riches en cellules *T helper* et CD8+, pauvres en Treg, exprimant fortement PD-L1 et présentant de nombreux néo-antigènes, qui vont plutôt bien répondre aux inhibiteurs des *checkpoints* de l'immunité, des tumeurs non inflammatoires (ou *cold*), avec beaucoup de Treg et peu de CD8, peu de néo-antigènes et une faible expression de PD-L1 [13, 14].

L'expression de PD-L1 est possiblement variable au cours de la progression tumorale, avec une concordance entre l'expression de PD-L1 dans la tumeur primitive et dans les métastases ganglionnaires qui ne serait que de 75 %, quels que soient les seuils de 1 %, 5 %, 10 % et 50 % [15]. Les prélèvements discordants correspondent le plus souvent à des échantillons tumoraux prélevés à plus de six mois d'intervalle [16]. Aux côtés de cette hétérogénéité qualifiée d'inter-tumorale, existe aussi une hétérogénéité intratumorale importante, bien connue des pathologistes, si bien qu'entre une biopsie préopératoire et la pièce opératoire correspondante, les discordances rapportées dans l'étude de Ilie *et al.* en matière d'expression de PD-L1 atteignent 48 % [17]. À noter que dans cette étude, c'est l'AC anti-SP142 qui a été utilisé ainsi que le *scoring* proposé lors de l'essai atézolizumab, qui combine deux scores d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires. Les discordances étaient les plus importantes quand le marquage des cellules du stroma était pris en compte, ce qui est logique si l'on considère qu'une biopsie est potentiellement pauvre en cellules immunitaires intra- ou péri-tumorales. Une autre étude récente utilisant d'autres anticorps primaires anti-PD-L1 a mis en évidence une concordance atteignant 92 % entre biopsies et pièces opératoires pour le marquage des cellules tumorales [18]. L'hétérogénéité tumorale pourrait être plus justement évaluée par une méthode quantitative utilisant des marqueurs fluorescents (QIF : *quantitative immunofluorescente*), mais les variations d'expression de PD-L1 d'un champ à l'autre existent malgré cela [19]. Enfin l'expression de PD-L1 peut aussi être modifiée par des traitements au cours de la maladie cancéreuse (radiothérapie, chimiothérapie, TKI) [20], avec des conclusions variables selon les études [21-25] et une concordance globale de 67 % entre les prélèvements réalisés avant ou après chimiothérapie [26]. Les inhibiteurs de tyrosine kinase pourraient diminuer l'expression de PD-L1 des tumeurs EGFR mutées et, à l'inverse, les tumeurs EGFR mutées devenant résistantes aux TKI pourraient exprimer plus fortement PD-L1 [27-29]. La question de la validité d'un tel marqueur et sa robustesse au cours de la progression

tumorale reste d'actualité, si bien qu'il paraît préférable de privilégier le prélèvement le plus récent par rapport à la décision d'administrer des ICI.

Valeur pronostique et prédictive de la réponse aux *immune checkpoint inhibitors*

L'expression de PD-L1 s'observe dans 7,4 à 73 % des carcinomes non à petites cellules. D'après une méta-analyse rassemblant 10 cohortes de 1 550 patients, cette expression semble corrélée à la faible différenciation des tumeurs et, à un moindre degré, au tabagisme. L'expression de PD-L1 semble liée à une diminution de la survie globale d'après certaines études [30], mais cela n'a pas été démontré dans une méta-analyse incluant 11 études de 1 653 patients [31]. L'ensemble de ces études est néanmoins à considérer avec précaution, certaines portant uniquement sur des populations asiatiques, et d'autres utilisant des anticorps anti-PD-L1 différents et des méthodes de *scoring* variables.

Dans la plupart des essais à l'aide d'agents bloquant l'axe PD-1/PD-L1, une expression immuno-histochimique de PD-L1 a été associée à des taux de réponse supérieurs, suggérant que l'expression de PD-L1 puisse servir de biomarqueur prédictif de la réponse à ces drogues (*cf. supra*) [32-37]. Cependant, ces études montrent également que certains patients répondent à ces médicaments alors que leur tumeur est PD-L1 négative [38] (*figure 1*). On peut néanmoins se demander si ces patients répondeurs ne présentent pas des tumeurs faussement négatives quand on connaît l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1. D'autres biomarqueurs prédictifs de la réponse aux anti-PD-1/PD-L1 sont proposés dans la littérature comme la charge mutationnelle, la clonalité T, des signatures de réponse à l'interféron gamma ou d'activation des T effecteurs, etc.

Évaluation immuno-histochimique

Outre les difficultés liées aux variations biologiques « dans l'espace et dans le temps » de l'expression de PD-L1, il existe un certain nombre de difficultés techniques liées aux étapes pré-analytique, analytique de réalisation des techniques d'immuno-histochimie et post-analytique du rendu de résultats. L'influence du pré-analytique (type de fixateur, durée et délai de fixation, âge des lames

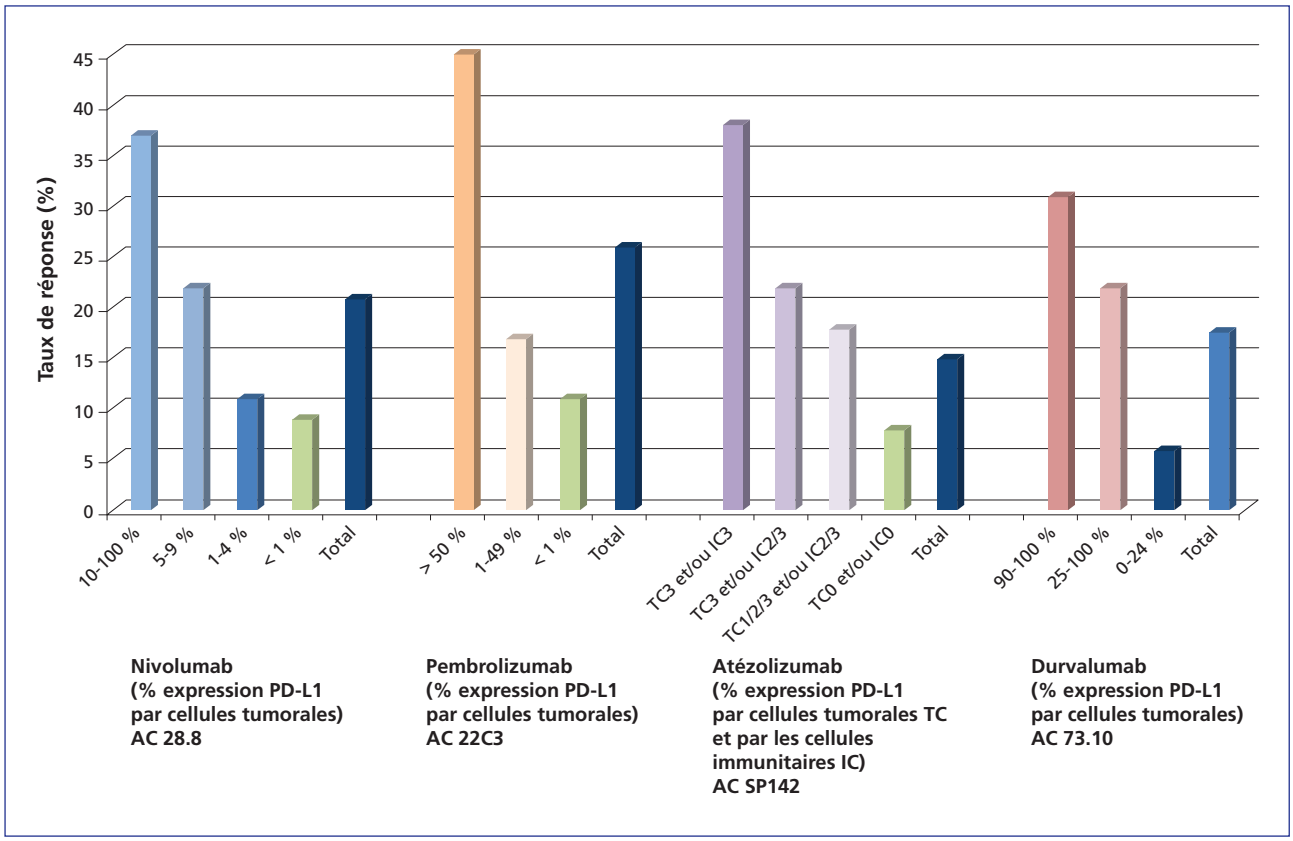

Figure 1. Taux de réponse aux différents anti-PD-1/PD-L1 en fonction de l'expression IHC de PD-L1 (d'après [38]).

Figure 1. *Rate of response to different anti-PD-1/PD-L1 antibodies based on IHC of PD-L1 (taken from [38]).*

précoupées) a été peu étudiée mais l'âge des blocs ne semblerait pas une difficulté, ce qui sous-entend que du matériel d'archive est utilisable [39], en dehors de toute considération clinique et biologique pouvant justifier de rebiopsier la tumeur. Il n'existe pas d'étude ayant évalué spécifiquement l'impact de la durée et des modalités de conservation des lames coupées sur le marquage PD-L1, mais dans les guides d'interprétation des différents tests, un délai maximum de conservation de deux mois pour le test SP142 (Ventana PD-L1 SP142 Assay, Ventana Medical Systems Inc), de quatre mois pour le test 28.8 PharmDx (Agilent Technologies/Dako) et de six mois pour le test 22C3 PharmDx (Agilent Technologies/Dako) des lames non colorées est recommandé. De la même manière, il est recommandé de ne pas utiliser les échantillons décalcifiés pour évaluer le statut PD-L1, les tests standardisés n'ayant pas été validés cliniquement pour des prélèvements décalcifiés.

Concernant l'étape analytique, jusqu'à 12 anticorps dirigés contre PD-L1 sont décrits dans la littérature et quatre principaux anticorps diagnostiques ont été utilisés dans les essais cliniques. Ces anticorps sont d'isotype et de source variables (recombinants *versus* polyclonaux), et sont dirigés contre des épitopes différents, les clones 22.8 et 22C3 (Dako, Carpinteria, CA) reconnaissant un épitope membranaire quand le SP142 et le SP263 (Ventana, Roche Diagnostics, Tucson, Arizona) reconnaissent un épitope cytoplasmique. Les anticorps 22C3 et 28.8 sont commercialisés soit « nus », c'est-à-dire pouvant être utilisés sur n'importe quel automate d'immunohistochimie, soit sous forme de kits, comme SP142 et SP263. Ces kits incluent toutes les solutions et tampons nécessaires à la technique dont la solution de détection et éventuellement d'amplification ; ils sont utilisables uniquement sur automates ou plateformes dédiées, ce qui pose problème aux laboratoires de pathologie rarement équipés de plusieurs plateformes (*tableau 1* et *figures 2 et 3*). L'anticorps E1L3N® (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, États-Unis) largement utilisé dans la littérature scientifique n'a pas été utilisé comme biomarqueur dans un essai clinique.

L'utilisation du test IHC 22C3 pharmDX (Dako, Carpinteria, CA) sur automate Dako Link 48 et du test SP263 sur automate Ventana, sous la forme des kits incluant la solution de révélation, a été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) (test compagnon diagnostique) pour sélectionner les patients bénéficiant du pembrolizumab (Keytruda®, Merck Shape Dohme, Kenilworth, New Jersey). Le seuil de positivité retenu est de 1 % de cellules tumorales positives pour la prescription du pembrolizumab en deuxième ligne et au-delà, et de 50 % en première ligne. La prescription d'autres inhibiteurs de PD-1/PD-L1 en deuxième ligne et au-delà n'est pas conditionnée par la détection d'une expression de PD-L1 en IHC. Le test IHC 28.8 pharmDX® (Dako, Carpinteria, CA) également sur automate Dako Link 48 était considéré comme un test compagnon « complémentaire » dans les carcinomes non épidermoïdes pour la prescription de nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb, New York), avec un seuil de positivité retenu de 1 % dans l'essai

Tableau 1. Tests IHC pour le statut PD-L1 (d'après [40]).
Table 1. *IHC of PD-L1 (taken from [40]).*

	Nivolumab	Pembrolizumab	MPDL3280A	MEDI4736
Type d'anticorps	Humanisé Ig-G4	Humanisé Ig-G4	Ig-G1	Ig-G1
Laboratoire	Bristol-Myers Squibb	Merck Sharp and Dohme	Roche, Genentech	Medimmune, AstraZeneca
Clone	Dako AC 28.8 PharmDX	Dako AC 22C3 PharmDX (test compagnon)	Genentech AC SP142	Ventana AC SP263
Automate	Dako Autostainer Link48	Dako Autostainer Link48	Benchmark Ventana platforms	Benchmark Ventana platforms
Cellules	Tumorales	Tumorales	Cellules tumorales et immunitaires	Tumorales
Seuil	1 % et 5 % sur 100 cellules	1-49 % : faible $\geq$ 50 % : fort	TC3/IC3 $\geq$ 50 % TC2/IC2 $\geq$ 5-49 % TCI/ICI $\geq$ 1-4% TC0/IC0 $<$ 1 %	$\geq$ 25 %
Proportion de PD-L1+	1 % : 56 %	1-49 % : 38 %	TCI/ICI : 75 %	48%
	5 % : 49 %	$\geq$ 50 % : 25 %	TC/IC2 : 14% TC/IC3 : 11 %	
Moment de la biopsie	Archive	Récente	Archive ou récente	Archive ou récente

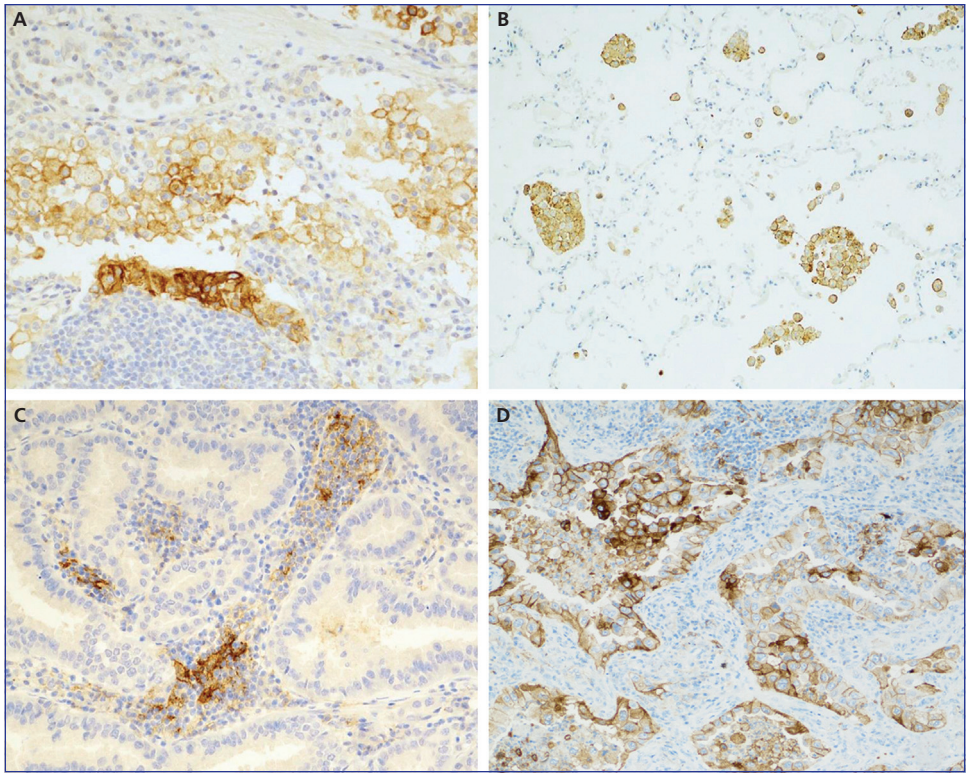

Figure 2. (A) et (B) Expression de PD-L1 par les macrophages alvéolaires (anticorps 22C3 et SP142). (C) Adénocarcinome acinaire négatif (cellules immunitaires positives ; anticorps 28.8). (D) Adénocarcinome acinaire montrant une expression par plus de 50 % de cellules tumorales avec une intensité de 1 à 3+ (anticorps SP263). (Grandissement original x 200).

Figure 2. *(A) and (B) Expression of PD-L1 by alvealoar macrophages (antibodies 22C3 and SP142). (C) Negative acinar adenocarcinoma (positive immune cells; antibody 28.8). (D) Acinar adenocarcinoma with more than 50% tumour cells showing an intensity of 1 to 3+ (antibody SP263). (Original magnification: x200).*

CheckMate 057, mais l'intérêt du score PD-L1 par IHC avec un seuil à 5 % n'a pas été confirmé dans l'essai CheckMate 026 (*press release* août 2016).

Plusieurs études ont comparé ces différents anticorps sous forme de kits mais actuellement aucune d'entre elles n'a vraiment proposé d'harmoniser ces anticorps et sur toutes les plateformes. La première étude comparative, « *Blue Print Project* », menée par le panel des pathologistes de l'*International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) a comparé sur un set de 39 cancers non à petites cellules (CBNPC) les immunomarquages anti-PD-L1 à l'aide des anticorps SP142, SP263, 22C3, 28.8 ; toutefois les marquages ont été réalisés de façon centralisée par les compagnies Dako et Roche Ventana et ont été interprétés par leurs pathologistes. Il en ressort une grande confusion dans la présentation des résultats mais le sentiment qui prédomine est que l'anticorps SP142 semble le moins robuste pour l'interprétation au niveau des cellules tumorales et des cellules immunitaires, et que la concordance entre les tests, en appliquant les seuils recommandés pour chaque test, est médiocre (seules 19 sur 38 tumeurs ont été évaluées de façon concordante).

L'étude allemande « *Round Robin* » de Scheel *et al.* [41] a comparé 15 CBNPC marqués de façon centralisée par les anticorps 28.8, 22C3, SP142, SP263, interprétés par neuf pathologistes de façon indépendante. La concordance entre les anticorps, pour des seuils à 1, 5, 10, et 50 %, était relativement bonne pour les cellules tumorales (*Kappa value* = 0,6-0,8), mais médiocre pour les cellules immunitaires (*Kappa value* = 0,2). Les clones 28.8 et 22C3 pour un seuil à 1 % étaient comparables, le SP142 apparaissant comme le moins performant, sauf pour les cellules immunitaires, et le SP263 comme le meilleur pour les deux populations cellulaires. Il en ressort que, si l'utilisation de tests standardisés (ou kits) doit être favorisée dans la mesure du possible, les tests SP163 (Ventana PD-L1 SP263 Assay, Ventana Medical Systems Inc), le test 28.8 pharmDx (Agilent Technologies/Dako) et le test 22C3 pharmDx (Agilent Technologies/Dako) offrent une très bonne concordance pour le marquage PD-L1 des cellules tumorales dans les CBNPC [41-44], ce qui n'est pas le cas du test SP142 qui marque moins bien les cellules tumorales. Par ailleurs, des données préliminaires de l'étude *Blue Print 2* des pathologistes de l'IASLC suggèrent que le test utilisant l'anticorps 73-10 pharmDx (Agilent Technologies/

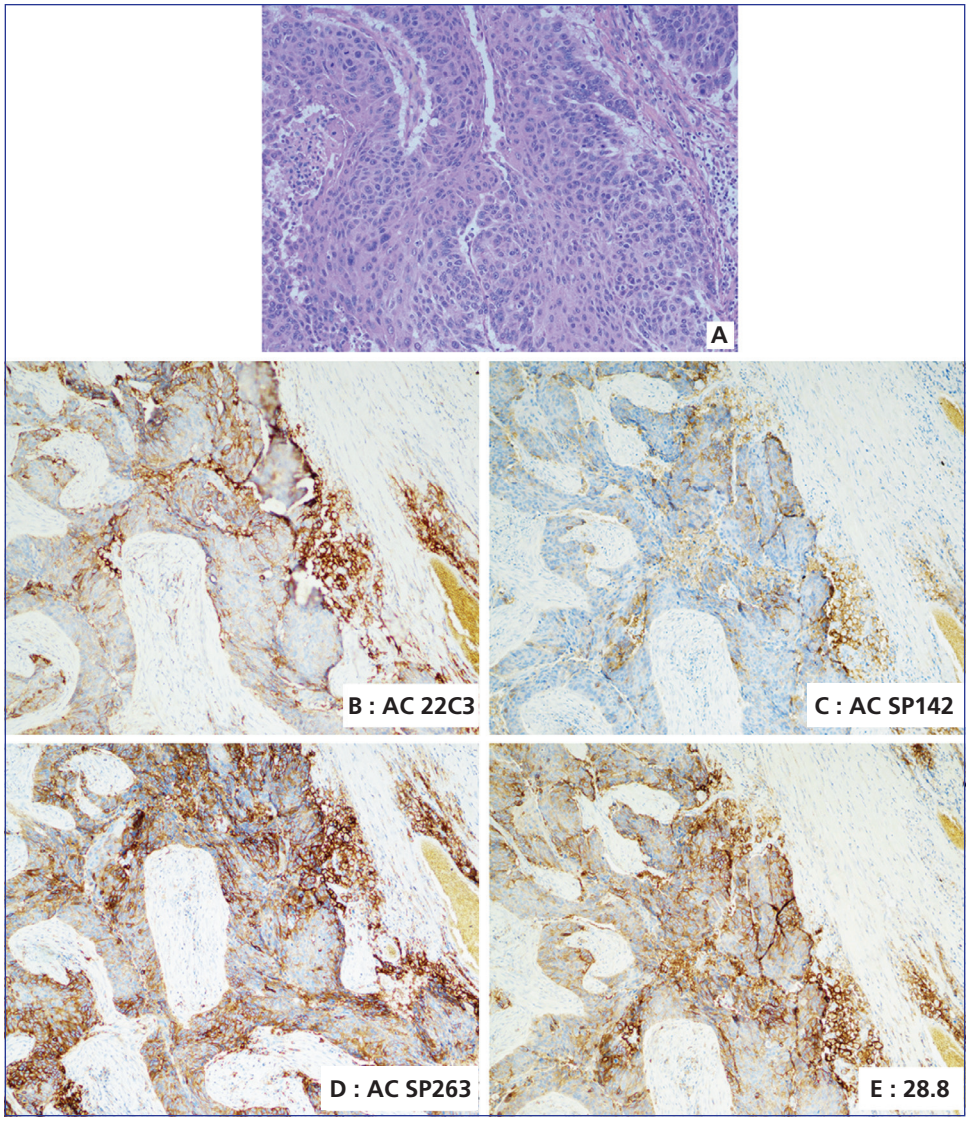

Figure 3. (A) Carcinome malphghien bien différencié (coloration par hématoxyline éosine safran [grandissement original x 200]). (B), (C), (D), (E) Immunomarquages anti-PD-L1.

Figure 3. *(A) Well differentiated squamous cell carcinoma (hematoxylin-eosin-safran staining; original magnification: x200). (B), (C), (D), (E), Immunostaining for anti-PD-L1.*

Dako) marquerait un pourcentage supérieur de cellules tumorales[1]. Les tests développés dans les laboratoires (*laboratory developed tests*, ou LDT dans la littérature anglo-saxonne) peuvent être utilisés pour évaluer l'expression de PD-L1. Leur concordance doit être validée en comparaison à un test (ou kit) de référence, et leur calibration doit faire l'objet d'une attention particulière. L'étude d'harmonisation multicentrique française conduite en 2016 a évalué un grand nombre de tests développés dans les laboratoires à partir d'anticorps concentrés [45]. Elle a mis en évidence que certains d'entre eux peuvent être concordants avec les tests standardisés (28.8, 22C3 ou SP263) pour le marquage des cellules tumorales.

Au-delà de ces difficultés majeures concernant la multiplicité des anticorps et des kits, se pose aussi la question de l'interprétation du marquage IHC PD-L1, et du libellé du compte-rendu par le pathologiste. Un marquage membranaire linéaire, complet ou non et quelle qu'en soit l'intensité, doit être pris en compte pour déterminer le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1. Il n'existe pas actuellement d'utilité clinique à l'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules immunitaires pour la prescription des traitements disponibles. Il faut s'assurer du marquage des témoins positifs externes et/ou

[1] http://www.jto.org/article/S1556-0864(17)30835-3/fulltext

internes (cellules immunitaires) et pour les échantillons de petite taille, d'un nombre minimum de cellules tumorales analysables, avec des réserves si leur nombre est inférieur à 100. Il est également possible d'émettre des réserves si les étapes pré-analytiques posent problème.

Le compte-rendu décrivant l'expression de PD-L1 doit mentionner la date, le siège, le type de prélèvement, la fixation, une éventuelle étape de décalcification ainsi que certains paramètres pouvant influencer l'expression de PD-L1, tels que le stade de la maladie, la notion de tumeur primitive, de récidive ou de métastase, les traitements antérieurs et éventuellement les altérations génomiques associées. Il doit indiquer l'anticorps (clone) et l'automate utilisé, et préciser s'il s'agit d'un test prêt à l'emploi ou d'un LDT. Il doit indiquer le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 (marquage membranaire). Les mentions test positif ou négatif ou d'éligibilité à certaines immunothérapies en fonction des seuils ne sont pas recommandées car les stratégies thérapeutiques sont en constante évolution et dépendent de nombreux autres paramètres cliniques.

RÉFÉRENCES

1. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012 ; 12 (4) : 252-64.

2. Ota K, Azuma K, Kawahara A, *et al.* Induction of PD-L1 expression by the EML4-ALK oncoprotein and downstream signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2015 ; 21 (17) : 4014-21.

3. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, *et al.* Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013 ; 3 (12) : 1355-63.

4. Koh J, Go H, Keam B, *et al.* Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol* 2015 ; 28 (9) : 1154-66.

5. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015 ; 348 (6230) : 124-8.

6. Zhu J, Chen L, Zou L, *et al.* MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Hum Immunol* 2014 ; 75 (4) : 348-53.

7. Fujita Y, Yagishita S, Hagiwara K, *et al.* The clinical relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3- mediated PD-L1 network in chemoresistant non-small-cell lung cancer. *Mol Ther* 2015 ; 23 : 717-27.

8. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, *et al.* Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 5241.

9. Ribas A. Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack. *Cancer Discov* 2015 ; 5 (9) : 915-9.

10. Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother* 2007 ; 30 (3) : 251-60.

11. Ikeda S, Okamoto T, Okano S, *et al.* PD-L1 Is upregulated by simultaneous amplification of the PD-L1 and JAK2 genes in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2016 ; 11 (1) : 62-71.

12. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* 2014 ; 74 (3) : 665-74.

13. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 2016 ; 8 (328) : 328rv4.

14. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and T (regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med* 2013 ; 5 (200) : 200ra116.

15. Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung Cancer* 2015 ; 88 (1) : 24-33.

16. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, *et al.* Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Ann Oncol* 2016 ; 27 (10) : 1953-8.

17. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, *et al.* Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2016 ; 27 (1) : 147-53.

18. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, *et al.* Reliability of small biopsy samples compared with resected specimens for the determination of programmed death-ligand 1 expression in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015 ; 16 (5) : 385-90.

19. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, *et al.* Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2016 ; 2 (1) : 46-54.

20. Kao CJ, Wurz GT, Lin YC, *et al.* Assessing the effects of concurrent *versus* sequential cisplatin/radiotherapy on immune status in lung tumor-bearing C57BL/6 mice. *Cancer Immunol Res* 2015 ; 3 (7) : 741-50.

21. Haratake N, Toyokawa G, Tagawa T, *et al.* Positive conversion of PD-L1 expression after treatments with chemotherapy and nivolumab. *Anticancer Res* 2017 ; 37 (10) : 5713-7.

22. Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M. Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via TGF-P induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lungcancer. *Oncol Rep* 2017 ; 38 (4) : 2277-84.

23. Zhang P, Ma Y, Lv C, *et al.* Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Sci* 2016 ; 107 (11) : 1563-71.

24. Song Z, Yu X, Zhang Y. Altered expression of programmed death-ligand 1 after neo-adjuvant chemotherapy in patients with lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 2016 ; 99 : 166-71.

25. Sheng J, Fang W, Yu J, *et al.* Expression of programmed death ligand-1on tumorcells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 20090.

26. Cho JH, Sorensen SF, Choi YL, *et al.* Programmed death ligand 1 expression in paired non-small cell lung cancer tumor samples. *Clin Lung Cancer* 2017 ; 18 (6) : e473-9.

27. Lin K, Cheng J, Yang T, Li Y, Zhu B. EGFR-TKI down-regulates PD-L1 in EGFR mutant NSCLC through inhibiting NF-kB. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 463 (1–2) : 95-101.

28. Jiang XM, Xu YL, Huang MY, *et al.* Osimertinib (AZD9291) decreases programmed death ligand-1 in EGFR-mutated non-small cell lung cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2017 ; 38 (11) : 1512-20.

29. Han JJ, Kim DW, Koh J, *et al.* Change in PD-L1 expression after acquiring resistance to gefitinib in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2016 ; 17 (4) : 263-70.e2.

30. Pan ZK, Ye F, Wu X, An HX, Wu JX. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis* 2015 ; 7 (3) : 462-70.

31. Zhong A, Xing Y, Pan X, Shi M, Xu H. Prognostic value of programmed cell death-ligand 1 expression in patients with non-small cell lung cancer: evidence from an updated meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2015 ; 8 : 3595-601.

32. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015 ; 372 (21) : 2018-28.

33. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014 ; 515 (7528) : 563-7.

34. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012 ; 366 (26) : 2443-54.

35. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, *et al.* Nivolumab *versus* docetaxel in advanced non squamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015 ; 373 (17) : 1627-39.

36. Herbst RS, Baas P, Kim DW, *et al.* Pembrolizumab *versus* docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016 ; 387 (10027) : 1540-50.

37. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, *et al.* Atezolizumab *versus* docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016 ; 387 (10030) : 1837-46.

38. Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med* 2016 ; 13 (2) : 157-70.

39. Midha A, Sharpe A, Scott M, *et al.* PD-L1 expression in advanced NSCLC: Primary lesions *versus* metastatic sites and impact of sample age. *ASCO meeting* 2016.

40. Girard N. L'immunothérapie des cancers bronchopulmonaires non à petites cellules : actualités et perspectives. *La Lettre du Pneumologue*, n° 6, décembre 2015.

41. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, *et al.* Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2016 ; 29 (10) : 1165-72.

42. Cooper WA, Russell PA, Cherian M, *et al.* Intra- and interobserver reproducibility assessment of PD-L1 biomarker in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2017 ; 23 (16) : 4569-77.

43. Rimm DL, Han G, Taube JM, *et al.* A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2017 ; 3 (8) : 1051-8.

44. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, *et al.* Agreement between programmed cell death ligand-1 diagnostic assays across multiple protein expression cutoffs in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2017 ; 23 (14) : 3585-91.

45. Adam J, Le Stang N, Rouquette I, *et al.* Multicenter French harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018 ; 29 : 953-8..