



Mathematical modelling of immunotherapies associated with radiotherapy in the treatment of cancers

Raphaël Serre

► To cite this version:

Raphaël Serre. Mathematical modelling of immunotherapies associated with radiotherapy in the treatment of cancers. Life Sciences [q-bio]. Aix-marseille université, 2022. English. NNT: . tel-03939070

HAL Id: tel-03939070

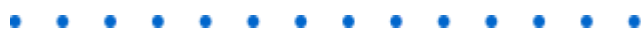
<https://hal.science/tel-03939070>

Submitted on 14 Jan 2023

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.

Public Domain



THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 4 mars 2022 par

Raphaël Serre

**Modélisation mathématique des
immunothérapies associées à la radiothérapie
dans le traitement des cancers**

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Oncologie

École doctorale

62 Sciences de la Vie et de la
Santé

Laboratoire

CRCM, COMPO

•

Composition du jury

• Pr Dominique BARBOLOSI Directeur de thèse,

• Aix Marseille Université

• Pr Fabrice BARLESI Président du jury,

• Institut Gustave Roussy

• Dr Sébastien BENZEKRY Examineur

• CRCM-INRIA

• Pr Eric DEUTSCH Rapporteur,

• Institut Gustave Roussy

• Pr Françoise MORNEX Rapporteuse

• Hospices Civils de Lyon

• Dr Xavier MURACCIOLE Examineur,

• Assistance Publique Hôpitaux de Marseille

• Dr Benjamin RIBBA Examineur,

• ROCHE Pharma Research & Early Development

• Pr Eric VIVIER Examineur

• Innate Pharma, Aix Marseille Université

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse, le Pr Dominique Barbolosi, pour sa confiance, son soutien, ses conseils et son impact sur mon cheminement scientifique.

Je remercie le Dr Xavier Muracciole pour sa bienveillance et son enseignement lorsque j'étais externe en médecine, il m'a inspiré dans mes travaux et donné envie de devenir oncologue-radiothérapeute.

Je remercie le Pr Fabrice Barlesi, pour son soutien déterminant à l'approche transdisciplinaire de l'équipe COMPO et la dynamique issue de sa vision globale.

Je remercie le Dr Sébastien Benzekry, directeur de l'équipe COMPO pour ses conseils, son expertise et sa disponibilité et tous les collaborateurs de l'équipe COMPO avec qui j'ai pu échanger, en particulier le Pr Athanassios Iliadis, la Pr associée Florence Gattacceca, la Pr Laetitia Padovani, le Pr Nicolas André, sans oublier certains anciens collaborateurs de l'équipe, comme la Dr Vesna Cuplov.

Je remercie bien sûr le Pr Joseph Ciccolini, codirecteur de l'équipe COMPO, qui m'a encouragé à faire cette thèse et a apporté son soutien pour les formations et les participations aux congrès.

Je remercie le Pr Eric Deutsch d'avoir rapporté sur ce travail et pour ses remarques constructives, j'espère que nous continuerons à avoir des collaborations fructueuses à l'avenir.

Je remercie la Pr Françoise Mornex d'avoir rapporté sur ce travail, pour ses remarques constructives et pour ses conseils de développer les perspectives cliniques de ces travaux.

Je remercie le Pr Eric Vivier pour la qualité de son enseignement en immunologie lorsque j'étais externe en médecine, pour m'avoir fait plus tard l'honneur d'accepter de juger ces travaux et les conseils prodigués.

Je remercie le Dr Benjamin Ribba pour avoir donné la précieuse appréciation d'un professionnel de la modélisation pharmaceutique.

J'exprime ma gratitude au Dr Christophe Meille pour son aide fréquente en pharmacocinétique et la prise en main du logiciel MONOLIX, enseignée avec pédagogie et patience.

Je remercie le Pr Jean-Louis Mège, Directeur de L'Ecole Doctorale 62.

Je remercie enfin l'équipe de radiothérapie au CHU Limoges, pour ses encouragements, en particulier le Pr Pierre Clavère, la Dr Hélène Orliac, la Dr Gladys Mauriange-Turpin, la Dr Audrey Larnaudie et notre physicien coordonnateur, Romain Turcat, pour sa relecture attentive du manuscrit.

Je remercie enfin mon épouse, la Dr Elissa Cousin-Serre pour son soutien global, du moral jusqu'aux aspects techniques de la programmation web.

Affidavit

Je soussigné, Raphaël Serre, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Dominique Barbolosi, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Aix sur Vienne, le 2 octobre 2021.

Affidavit

I, undersigned, Raphaël Serre, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Dominique Barbolosi, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Aixe sur Vienne, 10/02/2021.

Liste de publications et participations aux conférences

Liste de publications dans le cadre du projet de thèse

1. Serre R, Benzekry S, Padovani L, Meille C, Andre N, Ciccolini J, et al. Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy. *Cancer Research*. 1 sept 2016;76(17):4931-40.

2. Serre R, Barlesi F, Muracciole X, Barbolosi D. Immunologically effective dose: a practical model for immuno-radiotherapy. *Oncotarget*. 7 août 2018;9(61):31812-9.

Conférences

2015: Atelier National de Radiothérapie Pédiatrique, Ajaccio (Orateur)

2016: 10ème forum MACC, Saint Paul de Vence (Orateur)

2016: AACR, New Orleans, USA (Poster: radiotherapy and immunotherapy in cancer: a mathematical model)

2017: PAMM, Split, Croatia (Poster: chemo-immunotherapy, in-silico modeling in treatment of solid tumor)

2017: AACR, Washington DC, USA (Poster: chemo-immunotherapy, in-silico modeling in treatment of solid tumor)

2018: congrès Immunorad, Paris (Orateur)

Abstract

Radiation therapy and immunotherapy are two fundamental modalities in anti-cancer therapeutic strategies: almost half of the patients are treated by radiation therapy at least once during their treatment, while the indications for immunotherapies have greatly progressed in recent years with the rapid development of immune checkpoint inhibitors and CAR T cells. These modalities have a strong potential for synergy in combination: animal experiments have shown that antigenic release induced by radiotherapy can potentiate the efficacy of immunotherapy. Numerous combination clinical trials are currently underway, some of which have been published recently. The clinical results are encouraging, but further progress is needed to specify the optimal modalities of administration of immuno-radiotherapy. In particular, the sequencing of the two modalities and the fractionation of the radiotherapy need to be clarified. In this thesis, we have provided answers by proposing a numerical modeling approach. Two mathematical models are presented, with the two corresponding papers, which address the issues of sequencing and fractionation for immuno-radiotherapy. The validity of the predictions of these models in the light of the most recent clinical data will be highlighted and discussed and their relevance will be highlighted. A detailed review of the available safety data for the combinations of radiotherapy with some of the most common immune checkpoint inhibitors has been performed: it is shown that tolerance and toxicity could be limiting factors in the widespread adoption of immuno-radiotherapy, as some recent clinical studies have shown an increased rate of toxicities. We hope that this theoretical advance will allow the design of radiotherapy regimens with excellent immunogenicity, without compromising radiocurability. Further studies will be needed to confirm these preliminary results in a larger number of patients and to integrate the toxicity data of immuno-radiotherapy.

Keywords : oncology, radiation therapy, radiotherapy, immunotherapy, immuno-radiotherapy, immune checkpoint inhibitors, mathematical modeling, linear quadratic model, immunologically effective dose

Résumé

La radiothérapie et les immunothérapies sont deux modalités fondamentales dans les stratégies thérapeutiques anti cancéreuses: près de la moitié des patients est traitée par radiothérapie au moins une fois au cours de sa prise en charge, tandis que les indications des immunothérapies ont largement progressé depuis ces dernières années avec le développement rapide des inhibiteurs de checkpoint immunitaires mais aussi des CAR T cells. Ces modalités ont un fort potentiel de synergie en combinaison: des expériences animales ont montré que le relargage antigénique induit par la radiothérapie peut potentialiser l'efficacité de l'immunothérapie. De nombreux essais cliniques de combinaison sont actuellement en cours, quelques-uns ont été publiés récemment. Les résultats cliniques sont encourageants mais des avancées sont nécessaires pour préciser les modalités d'administration optimale de l'immuno-radiothérapie. En particulier, le séquençement des deux modalités et le fractionnement de la radiothérapie doivent être précisés. Dans cette thèse, nous avons apporté des réponses en proposant une approche de modélisation numérique. Deux modèles mathématiques sont présentés, avec les deux articles correspondants, qui adressent entre autres les questions du séquençement et du fractionnement pour l'immuno-radiothérapie. La validité des prédictions de ces modèles à la lumière des données cliniques les plus récentes sera discutée et leur pertinence sera soulignée et critiquée. Une revue détaillée des données de tolérance disponibles a été entreprise pour les combinaisons de radiothérapie avec les inhibiteurs de checkpoint les plus répandus actuellement: il est montré que la tolérance et les toxicités pourraient constituer un facteur limitant pour le développement de l'immuno-radiothérapie, alors que certains essais cliniques ont montré une augmentation des taux de toxicité. Nous espérons que cette avancée théorique permettra de concevoir des schémas de radiothérapie avec une excellente immunogénicité, sans compromis sur la radiocurabilité. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires sur un plus grand nombre de patients et pour intégrer les données de toxicité de l'immuno-radiothérapie.

Mots-clés: oncologie, radiothérapie, immunothérapie, inhibiteurs de checkpoint, modélisation mathématique, modèle linéaire-quadratique, dose immunologique efficace

Résumé grand public

La radiothérapie et les immunothérapies sont deux stratégies anti-cancéreuses fondamentales. Ces modalités ont un fort potentiel de synergie, car le relargage antigénique produit par la radiothérapie peut augmenter la réponse immunitaire, comme un vaccin. Des essais cliniques de combinaison sont en cours, certains résultats sont encourageants mais des avancées sont encore nécessaires pour préciser les modalités d'administration optimale de l'immuno-radiothérapie: le séquençement des deux modalités et le fractionnement de la radiothérapie doivent être précisés. Dans cette thèse, nous avons essayé de répondre par des modélisations numériques. La validité de ces modèles sera discutée à la lumière des données cliniques les plus récentes. Une revue des données de tolérance a aussi été faite: les toxicités pourraient être un facteur limitant, car des essais cliniques ont montré une augmentation des toxicités. Nous espérons utiliser ces modèles pour concevoir des schémas de radiothérapie avec une bonne immunogénicité. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer des résultats préliminaires et intégrer les données de toxicité.

Abstract (simplified)

Radiation therapy and immunotherapies are two fundamental anti-cancer strategies. These modalities have a strong potential for synergy, as the antigenic release produced by radiotherapy can increase the immune response, like a vaccine. Combination clinical trials are underway, some results are encouraging but further progress is needed to specify the optimal administration modalities of immuno-radiotherapy: the sequencing of the two modalities and the fractionation of the radiotherapy must be specified. In this thesis, we have tried to answer this question by numerical modelling. The validity of these models will be discussed in the light of the most recent clinical data. A review of tolerance data was also done: toxicities could be a limiting factor, as clinical trials have shown an increase in toxicities. We hope to use these models to design radiotherapy regimens with good immunogenicity. Further studies will be needed to confirm preliminary results and integrate toxicity data.

Table des matières

Remerciements	2
Affidavit	4
Affidavit	5
Liste de publications et participations aux conférences	6
Liste de publications dans le cadre du projet de thèse	6
Conférences	6
Abstract	7
Résumé	8
Résumé grand public	9
Abstract (simplified)	9
Table des matières	10
Introduction: radiothérapie et immunothérapie des cancers	14
Etat des connaissances	17
Place de la modélisation mathématique en médecine	17
Définitions	17
Modèles mécanistiques	17
Modèles phénoménologiques	17
Modèles statistiques	18
Intelligence artificielle, techniques de machine learning	19
Exemples de modélisations appliquées à l'oncologie	19
Synthèse	22
Eléments de cancérogénèse	24
Prolifération incontrôlée	24
Echappement aux signaux inhibiteurs	25
Echappement à l'inhibition de contact	25
Echappement à la mort cellulaire	25
Néo-angiogenèse	26
Diffusion métastatique	27
Instabilité génétique et épigénétique	29
Inflammation et cancer	30
Reprogrammation du métabolisme cellulaire	31
Echappement au système immunitaire	32
Radiothérapie: généralités	33
Rappels historiques	33
Les fondateurs	33

Premières applications médicales en oncologie	34
Techniques de radiothérapie externe	35
Accélérateurs linéaires (LINAC)	35
Tomothérapie	36
Cyberknife	37
IRM-LINAC	37
Protonthérapie	37
La radiothérapie interne : Curiethérapie	37
Définition et histoire de la Curiethérapie	37
Terminologie et techniques de Curiethérapie	38
Principes physiques de la Curiethérapie	39
La dose en radiothérapie	40
Le Gray	40
Les mesures d'activité: curie, becquerel	41
Mesure de dose efficace: Sievert	41
Quelques paramètres de dosimétrie en radiothérapie externe	42
Relations entre dose, efficacité et toxicité	43
Tissus à réponse (ou prolifération) rapide ou lente	43
Le modèle linéaire-quadratique (LQ)	44
Modèle LQ et doses équivalentes: EQD2 et BED	46
Facteur temps et modèle LQ	47
Limites du facteur temps dans le modèle LQ	49
Mécanismes d'efficacité de la radiothérapie	50
Radiobiologie "classique": les 4 Rs	50
Cytotoxicité directe	52
Rôle du système immunitaire	53
Mécanismes de résistance	54
Toxicités de la radiothérapie	54
Lien entre doses, volumes et toxicités	54
Toxicités aiguës et tardives	55
Immunothérapie: généralités	57
Aspects historiques	57
Présentation du système immunitaire	59
Immunité innée	59
Immunité adaptative	60
Dysfonctionnements de l'immunité	63
Inhibiteurs de checkpoint immunitaires (ICI)	65
Anti - CTLA 4	65
Anti -PD1 et anti -PD L1	67
Toxicités des immunothérapies	73
Mécanismes	73

Fréquence des principales toxicités graves des immunothérapies	75
Toxicités et combinaisons	76
Hyperprogression sous immunothérapie	77
Nouveaux développements	79
Ciblage des lymphocytes NK	79
Ciblage des TAM et autres cellules myéloïdes	81
CAR-T cells	82
Immuno-radiothérapie: généralités	84
Terminologie	84
Mécanismes d'efficacité de l'immuno-radiothérapie	84
Effet abscopal	87
Mécanismes de résistance	89
Immunosuppression radio-induite	90
Mécanismes radiobiologiques d'immunosuppression	90
Toxicités	93
Une synergie toxique?	93
Fréquence des irAEs et nombre de lésions traitées	96
Fréquence des irAEs et dose de radiothérapie	96
Pneumopathies auto-immunes	97
Lymphopénies et leucopénies	98
Dysphagie	99
Autres toxicités	99
Essais cliniques publiés et en cours	99
Tendances actuelles	101
Premier article	103
Présentation du modèle mathématique	103
Discussion	111
Masse tumorale critique	111
Durée de réponse aux inhibiteurs de checkpoint	115
Toxicités	116
Modélisation des traitements antiangiogéniques	117
Modélisation de l'immunogénicité des antigènes tumoraux	118
Modélisation de la mémoire-immunitaire	119
Synchronisation entre checkpoints inhibiteurs et radiothérapie	121
Reproduction du premier article	124
Premier article: données supplémentaires	135
Deuxième article	145
Introduction	145
Objectifs	145
Limites de la modélisation du premier article	146

Présentation du deuxième modèle	147
Dose immunologique efficace	151
Propriétés de la dose immunologique efficace	153
Applications de la dose immunologique efficace	154
Nouveaux schémas d'irradiation	154
Stéréotaxie vs radiothérapie classique	155
Absence d'immunogénicité de la radiothérapie classique (?)	157
Sensibilité à la cinétique (immunitaire et mort cellulaire)	158
Immuno-radiothérapie à dose ablative vs sub ablative	160
Limites de la dose immunologique efficace	161
Toxicités	161
Volumes d'irradiation	162
Prophylaxie ganglionnaire: amie ou ennemie?	162
Microbiome intestinal	165
Conclusion sur la dose immunologique efficace	165
Reproduction du deuxième article	167
Conclusion	175
Références bibliographiques	180

Introduction: radiothérapie et immunothérapie des cancers

Les cancers sont en France la première cause de mortalité chez l'homme, la seconde chez la femme, avec 33000 décès annuels par cancer du poumon, 17000 pour le cancer colorectal, 12000 par cancer du sein et 8000 pour le cancer de la prostate¹. Les cancers sont des maladies d'origine génétique où un ensemble de mutations aboutissent à une prolifération illimitée de cellules clonales, initialement localisée puis s'étendant aux organes distants. Les thérapeutiques anti-cancéreuses sont multimodales, adaptées au stade de la maladie ainsi qu'aux caractéristiques histologiques et éventuellement moléculaires de la maladie et elles associent chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, thérapies ciblées et immunothérapies.

La moitié des patients atteints de cancer reçoit de la radiothérapie à un moment de sa prise en charge, pour des traitements curatifs ou palliatifs. Les effets anti tumoraux des rayonnements ionisants permettent un fort taux de contrôle local et les techniques modernes de délivrance de la radiothérapie permettent des escalades de dose dans des volumes plus limités, sans dégrader la tolérance du traitement. Les rayonnements ionisants provoquent des dégâts dans l'ADN tumoral directement et par l'intermédiaire des réactifs activés de l'oxygène, qui induisent la mort cellulaire tumorale par apoptose ou nécrose. Mais les dégâts dans l'ADN des cellules saines de voisinage causent des toxicités et limitent les possibilités actuelles de la radiothérapie au traitement loco-régional. La radiothérapie, employée seule, n'a pas d'action anti-tumorale systémique.

Les chimiothérapies possèdent une action systémique mais leurs toxicités limitent les quantités administrables et les chimiorésistances apparaissent très fréquemment, d'emblée ou après une exposition de durée variable. Les thérapies ciblées possèdent également une action systémique mais leur efficacité peut être limitée par l'hétérogénéité tumorale et par la sélection de clones résistants.

Les immunothérapies, d'apparition relativement récente, ont connu un très fort développement depuis une dizaine d'années avec l'apparition d'anticorps inhibiteurs de checkpoint immunitaires, qui permettent chez certains patients de rétablir le contrôle immunitaire anti-tumoral en réactivant une réponse lymphocytaire T. Des indications d'immunothérapie existent aujourd'hui dans de nombreux cancers, préférentiellement

¹ Données de Santé Publique France, 2018.

au stade métastatique et localement avancé mais aussi au stade localisé. La perspective de contrôler le cancer par l'intermédiaire du système immunitaire est une révolution thérapeutique, et de nombreux patients ont bénéficié de durées de réponse très longues, parfois pendant de nombreuses années. Cependant, les taux de réponse aux immunothérapies en monothérapie sont faibles (environ 1 patient sur 5) et les réponses longues ne sont pas systématiques, ce qui réduit leur bénéfice à une minorité de patients. Il est désormais admis que les immunothérapies devront s'intégrer dans des stratégies multimodales afin d'augmenter leur bénéfice clinique.

L'idée de combiner radiothérapie et immunothérapie semble prometteuse car une partie de l'efficacité de la radiothérapie pourrait être médiée par le système immunitaire: la radiothérapie produit des néo antigènes tumoraux susceptibles de stimuler la surveillance lymphocytaire T, qui est justement la cible des immunothérapies par inhibiteurs de checkpoint. Des expérimentations animales ont fourni les preuves de concept initiales il y a plusieurs années et depuis peu, des données cliniques s'accumulent progressivement et viennent étayer la faisabilité de cette combinaison.

Depuis les premières expériences sur l'immuno-radiothérapie, des questions récurrentes ont été soulevées sur le séquençement idéal entre les deux modalités et sur la manière d'administrer la radiothérapie (son fractionnement). Dans cette thèse, nous avons tenté de présenter une réponse par le biais de la modélisation mathématique, en cherchant à prolonger certains modèles de radiothérapie. Nous présentons deux articles présentant deux modèles adressant pour le premier les notions de séquençement et pour l'autre les questions de fractionnement de l'immuno-radiothérapie, qui sont reproduits dans le texte.

Dans ce manuscrit, nous introduisons également de manière plus pédagogique ces deux modèles et nous discutons de leur pertinence à la lumière de données cliniques récentes.

Nous débutons par une partie introductive consacrée aux notions fondamentales de cancérogenèse, afin de replacer la radiothérapie et l'immunothérapie en perspective et de mieux faire apprécier leurs limites. La radiothérapie est ensuite présentée avec son histoire, ses concepts physico-biologiques et ses techniques contemporaines d'administration. Le fonctionnement du système immunitaire et des immunothérapies anticancéreuses est présenté, ainsi qu'un état de l'art sur l'immuno-radiothérapie, avant d'aborder successivement les deux modèles.

Nous soutiendrons que ces deux modèles répondent au problème initialement posé et qu'ils présentent un intérêt conceptuel mais aussi pratique, puisque le deuxième modèle a été conçu comme un outil de fractionnement à l'usage de l'oncologue-radiothérapeute, simple à utiliser et constituant une extension utile du modèle de fractionnement utilisé actuellement.

Etat des connaissances

Place de la modélisation mathématique en médecine

Définitions

La modélisation mathématique cherche à atteindre, par une ou plusieurs équations, une description simplifiée de la réalité afin, dans un premier temps, de décrire des phénomènes naturels observés, puis d'essayer de prédire la modification de ces phénomènes dans des conditions différentes. Pour atteindre cet objectif, elle repose sur des hypothèses de relations de causes à effet, simplifiées donc susceptibles d'erreurs et d'omissions, qui peuvent être volontaires (par choix de ne pas modéliser un phénomène non-pertinent) ou involontaires (par ignorance des phénomènes naturels ou par incapacité technique de les traduire en équations). La citation célèbre du statisticien George Box la résume ainsi: "*tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles*".

Au sein de ces modélisations mathématiques, on distingue les modèles *mécanistiques*, *phénoménologiques*, *statistiques*, et *l'intelligence artificielle*. Ces approches ont chacune leurs forces et leurs faiblesses. On présente ici brièvement leurs caractéristiques principales et l'on donne quelques exemples pratiques.

Modèles mécanistiques

Conceptuellement assez naturels, les modèles *mécanistiques* cherchent à décrire sinon tout, du moins un grand nombre de causes naturelles (observables ou non) afin d'obtenir une bonne capacité de prédiction au niveau du *phénomène* observé. En biologie, ces modèles sont populaires mais se heurtent à la difficulté d'obtenir des valeurs fiables pour leur grand nombre de paramètres. Ils peuvent cependant avoir une réelle valeur qualitative, et moins fréquemment quantitative, lorsque les paramètres ont pu être fixés à des valeurs suffisamment réalistes et si les données expérimentales sont abondantes.

Modèles phénoménologiques

Les modèles *phénoménologiques* se veulent, en apparence, agnostiques quant aux causes profondes qui ont produit un certain *phénomène*, en revanche ils cherchent à décrire de manière quantitative ce phénomène, avec une grande économie de

paramètres, qui doivent tous être précisément identifiables grâce aux données expérimentales. Traditionnellement, ces modèles sont l'apanage de la physique ou de la chimie. Ainsi les lois de la gravité, de l'électromagnétisme ou de la relativité tiennent en quelques lignes et leurs paramètres ont été identifiés avec une extrême précision. Les prédictions obtenues avec ces modèles sont extrêmement précises. Ces modèles ne font pas d'hypothèse sur le *pourquoi* des interactions, mais décrivent le *comment*, en utilisant des objets mathématiques qui décrivent le phénomène, sans l'expliquer complètement.

Modèles statistiques

Leur usage est très fréquent en médecine. Les modèles *statistiques* servent à identifier des facteurs fortement associés à un événement clinique (une durée de survie, un taux de réponse ou de complication). Comme les modèles *phénoménologiques*, ils ne décrivent pas des liens de cause à effet. Leur force est de mettre en lumière des facteurs fortement associés pour qu'un lien de cause à effet puisse être ultérieurement accepté ou rejeté. Leur simplicité d'utilisation vient du caractère stéréotypé des équations sur lesquelles ils reposent: par exemple, le logarithme de la probabilité de l'évènement d'intérêt sera une combinaison linéaire de facteurs explicatifs, dont les coefficients seront identifiés par une procédure d'estimation. Le choix du modèle se résume au choix des facteurs explicatifs.

Les modèles *statistiques* sont indispensables dans l'analyse des données cliniques. Ils permettent d'identifier des sous-groupes de patients bons ou mauvais répondeurs à un traitement et de générer des hypothèses de recherche.

Ils sont néanmoins trop simplistes pour décrire certains phénomènes, comme la relation entre la dose d'un médicament, son taux plasmatique et ses effets, qui sont du ressort de la *pharmacocinétique* et de la *pharmacodynamique*, reposant sur des modèles *phénoménologiques* (à base d'équations différentielles). Par exemple, lorsque que l'on analyse des données de toxicité chez des patients ayant consommé en une seule fois des doses différentes d'un même médicament: un modèle *statistique* peut établir une association entre la dose ingérée et la survenue de toxicité, mais il faut un modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique (de type *phénoménologique*) pour identifier une nouvelle modalité de prise permettant de diminuer les toxicités, par exemple en fractionnant la prise.

Intelligence artificielle, techniques de machine learning

Ces techniques se distinguent des précédentes par leur capacité à sélectionner de manière *autonome* des facteurs prédictifs. Elles sont également agnostiques quant aux relations de cause à effet (comme les modèles *statistiques* et *phénoménologiques*), mais se distinguent car elles peuvent s'affranchir d'équations pour reposer, par exemple, sur un réseau dynamique de connecteurs logiques pouvant évoquer le fonctionnement du connectome cérébral (réseaux de neurones), mais aussi sur des algorithmes de classification (arbres, forêt aléatoires, plus proche voisin...) ou des algorithmes d'optimisation fondés sur des théories mathématiques (machines à vecteur de support, régressions linéaires ou logistiques "améliorées" comme les méthodes Lasso, Elastic Net...dont certaines sont aussi des méthodes statistiques). Leur force repose donc dans une certaine capacité d'imitation du raisonnement humain, mais se limite à identifier des associations d'évènements, sans posséder la logique pour rejeter les associations purement fortuites. Cependant, bien employées, éventuellement complétées par une expertise humaine capable d'un raisonnement élaboré, leurs potentialités sont énormes. Elles nécessitent cependant une grande quantité de données pour générer des prédictions robustes, aussi ne sont-elles pas toujours adaptées aux problèmes médicaux ou biologiques, où les séries sont souvent à petits effectifs. Mais la constitution progressive de larges bases de données cliniques permettra progressivement de contourner ces problèmes.

Exemples de modélisations appliquées à l'oncologie

Nous citons à titre d'illustration un faible nombre de modèles mathématiques, sans aucune prétention à l'exhaustivité étant donné la masse et la variété des publications. Nous avons également privilégié des modèles dont nous serons amenés à parler dans la suite.

Modèles mécanistiques

La radiothérapie prolongée est connue pour entraîner des lymphopénies parfois profondes, dont l'impact sur l'efficacité des immunothérapies n'est pas bien cerné. Les causes premières sont débattues (irradiation des lymphocytes circulants?) mais des travaux de modélisation récents apportent un éclairage nouveau. Jin et al (1) ont construit un modèle de circulation des lymphocytes dans les gros vaisseaux et différents

organes qui établit les contributions respectives des irradiations des différentes unités. Le grand nombre de paramètres physiologiques, pour certains inobservables et fixés arbitrairement, le classe parmi les modèles mécanistiques. Ses conclusions qualitatives originales pourraient permettre aux oncologues-radiothérapeutes d'essayer des stratégies d'irradiation permettant de limiter les lymphopénies. Il serait intéressant d'explorer si des modèles *statistiques* confirment ces résultats (en cherchant des associations entre la dosimétrie et les lymphopénies).

Modèles phénoménologiques

L'exemple canonique de modèle *phénoménologique* en radiobiologie, est le modèle linéaire-quadratique, qui décrit la fraction survivante S de cellules irradiées par une certaine dose D (Gy) de rayonnement ionisant: $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$, avec α et β deux constantes positives que l'on peut estimer sur des données de survie *in vitro*, tandis que le rapport α / β peut-être estimé sur des données *in vivo*. Si les causes de la mort cellulaire par les rayonnements ionisants ne sont pas visibles dans cette équation, ce modèle demeure fondamental en radiobiologie. Par exemple, il permet de savoir comment réduire le nombre de fractions (hypofractionnement), en égalisant l'efficacité biologique de deux schémas d'irradiation utilisant des doses et un nombre de fractions différents (en écrivant la conservation de la grandeur S^n , avec n le nombre de fractions). Ce modèle a été souvent enrichi, notamment pour refléter le phénomène d'accélération de la croissance de la tumeur au cours de l'irradiation (*repopulation tumorale*), sous l'influence de Jack F. Fowler (2). Ce modèle a aidé à identifier des schémas de fractionnement alternatifs (hypofractionnement et hyperfractionnement).

Des modèles phénoménologiques ont été développés pour modéliser l'effet des chimiothérapies et rechercher des schémas d'administration sécurisés et efficaces. Cette modélisation est plus complexe que celles de la radiothérapie, en raison de la distribution systémique du traitement qui impose une modélisation pharmacocinétique et de la difficulté à modéliser les toxicités (en particulier hématologiques) qui nécessite une modélisation pharmacodynamique élaborée. L'essai clinique MODEL1 reste le premier essai clinique réussi d'escalade de dose et d'intensification² conduit par une

² intensification: signifie ici, le raccourcissement de l'intervalle de temps entre deux cures de chimiothérapie (deux semaines au lieu de trois semaines, dans cet exemple). Ce raccourcissement augmente la dose-intensité mais aussi le risque de toxicité hématologique grave.

équipe de modélisateurs en interaction avec les investigateurs (3,4). Il faut souligner le challenge, car ces deux classes de chimiothérapies étaient normalement utilisées séquentiellement, en raison des toxicités. Si cette chimiothérapie n'a pas trouvé sa place en clinique, la méthode générale développée à cette occasion a essaimé dans l'industrie pharmaceutique et sert encore aujourd'hui à guider des essais cliniques pour des molécules innovantes (5).

Modèles statistiques

Les études cliniques sont aujourd'hui publiées avec une analyse statistique comportant des outils familiers pour les médecins, comme les courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier, le calcul des *hazard ratios* dans la méthode de régression de Cox, les intervalles de confiance et la valeur p du test statistique adéquat.

Nous évoquons plus en détail les modèles de Markov, globalement moins familiers des médecins, mais qui possèdent une capacité intéressante à générer des hypothèses nouvelles, à partir de données statistiques parfois bien connues.

Par exemple, dans le cancer du sein chez la femme âgée, il existe une tendance actuelle à la désescalade thérapeutique, le rationnel étant que plus une patiente est âgée, moins il est probable que les traitements aient un impact sur sa survie. Les deux traitements concernés par cette désescalade seraient *a priori* l'hormonothérapie longue ou la radiothérapie. Dans la majorité des essais en cours, la radiothérapie est supprimée tandis que l'hormonothérapie est maintenue. Ce déséquilibre pose question, car les effets secondaires de l'hormonothérapie ont un impact sur la qualité de vie, tandis que les progrès de la radiothérapie du sein ont fortement diminué ses effets indésirables (comme la toxicité cardiaque). Dans ce contexte, des *micro-simulations* basées sur un modèle de Markov ont ré-analysé les données d'essais cliniques ayant évalué l'effet de la radiothérapie et de l'hormonothérapie. Cette analyse a permis d'identifier un sous-groupe de patientes à bas-risque chez lesquelles la radiothérapie seule serait équivalente à une hormonothérapie longue (6). Ces modélisations fondent le rationnel de futurs essais cliniques prospectifs visant à valider l'omission de l'hormonothérapie et le maintien de la radiothérapie (7).

Machine learning

Domaine en ébullition, dont l'analyse d'image est un des domaines de prédilection. Les *radiomics* désignent des techniques d'analyse d'image automatiques, basées sur l'extraction de caractéristiques d'images de manière semi-autonome par un réseau de neurones, qui à l'issue d'un processus d'apprentissage supervisé, pose un diagnostic automatique. De nombreux projets sur l'analyse des images de scanner X sont en cours; les objectifs sont très ambitieux, comme par exemple prédire l'infiltration tumorale par le système immunitaire (8), ou bien émuler les résultats de la tomographie par émission de positons au PSMA dans le bilan du cancer de prostate (9). Initialement présentés comme des "boîtes noires" sous l'angle de leurs seuls résultats de classification, des progrès sont en cours dans l'explication des résultats de ces algorithmes et permettront un jour de mieux en cerner les forces ou les faiblesses et éventuellement de pouvoir les intégrer en pratique clinique.

Synthèse

La modélisation en oncologie est présente sous de multiples formes, rend des services variés et parfois insoupçonnés. Elle peut donner à voir ce que l'esprit humain n'a pas clairement perçu (ainsi des *microsimulations* des modèles de Markov ou des *radiomics* en imagerie médicale), elle peut rendre possible ce qui ne l'est pas par les approches empiriques (ainsi des modèles de *pharmacocinétique* et *pharmacodynamique* ou PK-PD), elle peut parfois expliquer ce qui ne peut pas l'être autrement, faute de modèles animaux (ainsi de certains modèles *mécanistiques*).

La complexité de ces méthodes est variée: d'une équation tenant en une ligne à des algorithmes d'intelligence artificielle impossibles à décrire en langage naturel. Ce qui est simple est souvent plus répandu (exemple, le modèle linéaire quadratique connu de tous les oncologue-radiothérapeutes), mais ce qui est compliqué peut avoir une importance considérable dans des domaines spécialisés (comme la modélisation PK-PD). Il ne s'agit donc pas d'opposer les méthodes entre elles, mais de les utiliser en fonction des besoins.

Les travaux présentés dans cette thèse sont des variations et des extensions du modèle linéaire quadratique, ils visent à lui adjoindre une dimension immunologique qu'il ne possède pas actuellement; ces travaux sont donc essentiellement *phénoménologiques* mais on verra cependant qu'une part de leur inspiration est *mécanistique*. Nous espérons cependant qu'ils présentent une utilité et en particulier

qu'ils pourront guider des pratiques cliniques dans le domaine de l'immuno-radiothérapie.

Avant d'entrer dans le sujet de la modélisation, on présente des notions importantes sur la cancérogenèse, l'immunothérapie et la radiothérapie.

Eléments de cancérogenèse

Dans cette section sont présentées quelques caractéristiques des tumeurs malignes. Le travail effectué est concentré sur les rôles de la radiothérapie et de l'immunothérapie, mais il ne doit pas éclipser la variété des mécanismes impliqués, qui ont une large part dans les résistances aux traitements. Si la capacité de multiplication "infinie" des cellules tumorales est connue et si leur échappement au système immunitaire est devenue une notion familière, il faut replacer ces caractéristiques dans un ensemble plus grand de piliers qui fondent la cancérogenèse et permettent de mieux comprendre les limites de chaque thérapeutique. Nous résumons certains éléments du célèbre article *Hallmarks of Cancer* de Hanahan et Weinberg (10). On verra en particulier le rôle favorisant du microenvironnement tumoral non seulement dans l'échappement immunitaire, mais dans plusieurs autres piliers de la cancérogenèse.

Prolifération incontrôlée

Les cellules normales arrêtent de se diviser pour maintenir l'équilibre du tissu auquel elles appartiennent, mais les cellules cancéreuses sont capables d'une prolifération sans inhibition. La prolifération cellulaire est normalement dépendante de *facteurs de croissance* produits par des cellules qui "ressentent" la nécessité de croître en nombre et en taille pour assurer l'homéostasie de leur milieu, notamment grâce aux *intégrines*, protéines transmembranaires qui régissent les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces facteurs de croissance transitent par l'espace extracellulaire où ils peuvent être dégradés par des enzymes qui contrôlent leur disponibilité: le milieu extérieur à la cellule participe donc activement à cette homéostasie.

Les cellules tumorales ont plusieurs techniques pour échapper à cet équilibre: elles peuvent produire elle même le ligand du récepteur de facteur de croissance, elles peuvent exprimer un récepteur muté constitutivement activé (ou posséder une mutation activatrice à un autre niveau de la voie de signalisation), elles peuvent également influencer les cellules *non-cancéreuses* de leur voisinage pour que celles-ci produisent des facteurs de croissance. Le micro environnement tumoral joue donc aussi un rôle pro-mitotique.

Echappement aux signaux inhibiteurs

Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent interrompre la division cellulaire ou éventuellement induire la mort cellulaire: par exemple, la protéine RB (associée au rétinoblastome) réagit à des stimuli majoritairement extérieurs à la cellule pour bloquer les divisions, tandis que la protéine TP53 réagit à des signaux de stress cellulaire interne (des dommages dans l'ADN) pour faire entrer la cellule en mort programmée (apoptose). Il existe de nombreux gènes suppresseurs de tumeur, qui fonctionnent de manière redondante, de sorte que les mutations inactivatrices dans ces gènes ne produisent des cancers que relativement tard dans la vie d'un individu.

Echappement à l'inhibition de contact

Les cellules normales cessent de se diviser lorsqu'elles entrent en contact entre elles, par un processus physiologique d'inhibition de contact. Il existe plusieurs mécanismes redondants, impliquant des protéines capables de détecter le contact avec des cellules voisines (par exemple, via les protéines E-cadherin) pour réprimer l'activité de récepteurs de facteurs de croissance (comme l'EGFR) ou de certains oncogènes (comme le gène Myc).

Echappement à la mort cellulaire

Résistance à l'apoptose

Les cellules cancéreuses peuvent résister à la mort cellulaire programmée, qui est normalement activée par des signaux de stress. Cette mort découle de l'activation d'une cascade de protéases (les *caspases*) qui vont "digérer" la cellule de l'intérieur et permettre sa phagocytose par les macrophages. L'activation des caspases est contrôlée par deux grandes voies de signalisation, l'une réagissant à des signaux externes à la cellule (voie Fas - RB), l'autre à des signaux internes variés, qui peuvent être des dommages dans l'ADN (voie TP53), un déficit en facteurs de survie ou de croissance (par exemple, en *interleukine 2* pour les lymphocytes T), ou à l'inverse excès de concentration de certaines protéines pro-mitotique (comme l'oncogène Myc). De cette diversité de mécanismes d'induction de l'apoptose découle une grande diversité dans les manières possibles de la contourner: la perte de fonction de TP53 est répandue dans certains cancers, mais de nombreuses autres mutations aboutissent aussi à l'échappement à l'apoptose.

Autophagie et survie au stress cellulaire

Les cellules normales peuvent consommer certains de leurs constituants pour survivre en cas de pénurie de nutriments: l'autophagie permet à la cellule de consommer ses propres *ribosomes* et ses *mitochondries*. Ce processus probablement utile pour survivre à la dénutrition semble avoir été détourné par les cellules cancéreuses, non seulement pour permettre à des clones de survivre à des conditions de pénurie relative en nutriments (comme au sein d'un centre tumoral nécrotique), mais aussi pour survivre aux stress cellulaires induits par la radiothérapie et la chimiothérapie. L'autophagie induit une réduction de la taille de la cellule et l'entrée dans un état de d'hibernation dont elle sortira lorsque les conditions seront plus favorables, ce qui pourrait expliquer des récives après un traitement cytotoxique apparemment efficace, même après disparition de toute trace radiologique ou biologique de la tumeur.

Réplication cellulaire et télomérase

Les cellules normales doivent un jour cesser de se diviser (état de *sénescence*) ou bien mourir. Cette fin est retardée tant qu'il existe des *télomères* aux extrémités des chromosomes, ce qui empêche leur fusion par les bouts, puis une grande instabilité génétique et la mort cellulaire. Ces télomères, initialement nombreux, diminuent progressivement au cours des mitoses. Mais dans les cellules cancéreuses, une activité *télomérase* est très souvent présente, qui maintient le nombre des télomères, de sorte que la cellule cancéreuse est, sinon immortelle, du moins capable de se diviser à l'infini. Il est possible également que certaines cellules cancéreuses, bien que n'ayant pas d'activité télomérase, ont perdu tout contrôle de l'intégrité de leur génome et peuvent continuer à se diviser même avec des chromosomes fusionnés.

Néo-angiogenèse

Dans les tissus normaux, l'angiogenèse est un processus *transitoire* (comme lors de l'organogénèse, ou lors d'un processus de cicatrisation). Mais dans les tumeurs, l'angiogenèse est *constamment* active. L'angiogenèse est stimulée ou inhibée par diverses molécules de signalisation, le facteur pro-angiogénique emblématique est le VEGF-A, mais il en existe d'autres (comme la famille du FGF ou fibroblast growth factor)

tandis que le facteur inhibiteur le plus important est le TSP-1 (thrombospondin-1) mais plusieurs autres inhibiteurs ont été identifiés (angiostatine, endostatine, etc). L'expression du VEGF est augmentée en condition d'hypoxie et par certains oncogènes. A la différence des vaisseaux normaux, la néo-vascularisation tumorale produite par un excès de stimulation pro-angiogénique est aberrante: elle présente un excès de bifurcations et un déficit de solidité, la rendant fuyante, ce qui augmente la pression interstitielle et diminue la diffusion des médicaments mais aussi le recrutement cellulaire dans le microenvironnement tumoral. L'angiogenèse semble être présente dès les premières phases de la cancérogenèse (on avait tendance à l'associer initialement aux grandes tumeurs bien établies). La production des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF) semble être en grande partie l'oeuvre de cellules non-cancéreuses, recrutées dans le micro-environnement tumoral, comme les macrophages, neutrophiles ou des progéniteurs myéloïdes.

Diffusion métastatique

Les cellules normales adhèrent entre elles et à la matrice extracellulaire grâce à des molécules d'adhésion (comme la E-cadherin pour l'adhésion cellule-cellule, tandis que le lien avec la matrice extracellulaire repose sur de nombreuses molécules, par exemple les *intégrines*). Dans les cellules tumorales, la perte de fonction ou d'expression des molécules d'adhésion coïncide avec l'acquisition d'un potentiel d'invasivité et de diffusion métastatique. La diffusion a lieu par voie préférentiellement lymphatique (carcinomes) et parfois directement hématogène (sarcomes), par un processus en plusieurs étapes commençant par la prolifération locale, puis l'échappement dans les lymphatiques ou les vaisseaux, l'extravasation vers des tissus distants, la formation de micrométastases puis l'étape finale de *colonisation* qui aboutit à des métastases établies et volumineuses, capables d'être à l'origine d'un prochain cycle de diffusion métastatique³. Ces différentes étapes sont possibles grâce à des gènes regroupés sous le terme de *programme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)*, un processus de l'embryogenèse dont les fonctions sont "détournées" par les cellules cancéreuses. Le micro-environnement tumoral participe également: des *cellules souches*

³ Ces métastases établies peuvent aussi servir de milieu d'accueil favorable à la colonisation par d'autres cellules métastatiques en provenance du primitif ou même d'autres sites métastatiques (11), probablement par l'intermédiaire de leur microenvironnement favorable.

mésenchymateuses sécrètent des facteurs de transcription qui stimulent le caractère invasif des cellules tumorales, tandis que les macrophages associés à la tumeur (TAM) sécrètent des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire et la rendent plus perméable à la diffusion métastatique, ou encore produisent directement des facteurs de croissance (comme l'EGF) pour simuler la division des cellules tumorales. Le rôle facilitateur du micro-environnement tumoral pour la diffusion métastatique pourrait potentiellement relativiser le rôle des mutations somatiques tumorales: il n'existerait pas *nécessairement* de mutations spécifiques pour activer cette diffusion⁴.

L'étape de *colonisation* (de la micrométastase vers la macro métastase bien établie) n'est pas automatiquement enclenchée: les micrométastases peuvent entrer en période de dormance durant de très longues périodes (plusieurs années ou parfois plus d'une décennie) avant de progresser vers l'étape de colonisation (comme dans le cancer du sein ou de la prostate, où des récidives 10 ans après le traitement de la tumeur primitive sont non-exceptionnelles). Ces micrométastases peuvent aussi être réveillées de leur dormance peu après l'exérèse de la tumeur primitive, le mécanisme pouvant impliquer à la fois la disparition de facteurs inhibiteurs sécrétés par la tumeur primitive (thrombospondine, angiostatine, endostatine), ainsi que la production de facteurs de croissance lors de la cicatrisation post-opératoire⁵. Les mécanismes expliquant la colonisation, parfois très retardée, par des micrométastases sorties de leur dormance seraient multiples: fluctuations dans le niveau de contrôle immunitaire, activation tardive de l'angiogénèse, variations de la disponibilité de facteurs promoteurs ou inhibiteurs de croissance dans la matrice extra-cellulaire, plus grande disponibilité de nutriments. La colonisation de différents tissus implique a priori différents programmes génétiques et favorise également l'hétérogénéité clonale des métastases par rapport à la tumeur primitive, compliquant la stratégie thérapeutique en situation de récidive.

La dissémination de micrométastases peut parfois se produire dans des tumeurs n'ayant pas encore acquis les caractéristiques phénotypiques et génétiques de l'invasivité. Ainsi, la présence de micrométastases à une étape précoce est un

⁴ Les cas de récidives très tardive (au-delà de 8-10 ans) de cancer du sein ou de prostate de phénotype initialement favorable sont possiblement des exemples de diffusion métastatique précoce avant acquisition de phénotype invasif, médiée par le microenvironnement tumoral, suivie d'une dormance prolongée, puis d'une colonisation tardive pour des raisons inconnues.

⁵ Le phénomène d'accélération métastatique post-opératoire demeure rare en clinique avec l'emploi des chimiothérapies adjuvantes dans les formes à haut risque de métastases occultes. En revanche, le risque est significatif en cas de sous-estimation initiale du fardeau tumoral et de l'absence de traitement systémique péri-opératoire.

phénomène relativement fréquent, comme l'atteste la présence de cellules tumorales isolées et de micrométastases dans les ganglions sentinelles des cancers du sein localisés. Si les cellules tumorales isolées ne sont pas considérées comme cliniquement significatives, en revanche, la signification *clinique* des micrométastases est moins claire car les données scientifiques sont parfois contradictoires (12), aussi leur prise en charge peut différer selon les localisations et les *guidelines*.

Enfin, il est établi que les métastases établies peuvent à leur tour diffuser des métastases secondaires dans l'organisme, et que la tumeur primitive est un site privilégié pour accueillir le "retour" des cellules migrantes (11).

Instabilité génétique et épigénétique

La progression depuis une cellule normale vers des cellules tumorales au potentiel de prolifération et d'invasivité croissant se déroule selon une suite de modifications génétiques ou épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications des histones), qui confèrent tout ou partie de ces caractéristiques fondamentales. L'intégrité de l'ADN est normalement conservée par un système de protéines spécialisées dans la surveillance et la réparation des anomalies génétiques, cependant cette capacité de réparation est saturable, en particulier en cas d'augmentation de la quantité de lésions (comme par exposition à des agents mutagènes) et de la vitesse de division cellulaire. De surcroît, l'acquisition de certaines mutations perturbe directement la maintenance du génome, comme la perte de fonctionnalité de la protéine TP53 qui empêche l'entrée en apoptose suite à la détection de dégâts non réparables de l'ADN, mais de nombreuses autres mutations inactivatrices affectent un ou plusieurs des sous-systèmes de réparation de l'ADN (on en dénombre six⁶). Les télomères jouent également un rôle double dans la protection de l'intégrité chromosomique mais aussi dans la limitation de la durée de vie des cellules.

Dans les cancers, si l'instabilité génétique permet *a minima* l'acquisition des caractéristiques d'une cellule maligne, elle se développe ensuite à des degrés variés selon le système de réparation touché, le type de cancer et d'un individu à l'autre. Par exemple, pour les anomalies de mésappariement (mismatch repair), connu pour être un facteur de bonne réponse aux immunothérapies, on ne détecte leur phénotype

⁶ Les six systèmes de réparation connus sont la réparation 1) directe, 2) par excision de base, 3) par excision de nucléotide, 4) par réparation des mésappariements (mismatch repair), 5) par jonction d'extrémité non-homologues et 6) par recombinaison homologue.

caractéristique (MSI-H) dans plus de 5% que pour certains cancers du spectre du syndrome Lynch (cancer de l'endomètre et colorectal principalement), tandis que ce phénotype peut être inférieur à 5% ou quasi-inexistant dans la grande majorité des autres cancers (environ 1-3% pour les cancers ORL, les adénocarcinomes pancréatiques ou les cholangiocarcinomes, par exemple) (13). Globalement, si une certaine instabilité génétique est fréquente, sa significativité clinique est variable et représente un important axe de recherche, détaillé dans la section sur l'immunothérapie.

Inflammation et cancer

Toute tumeur solide est rapidement englobée dans un infiltrat de cellules non tumorales, dont la fonction est double: s'il s'agit initialement d'un infiltrat réactionnel visant à combattre les cellules tumorales, il a été supposé très tôt que cette inflammation pourrait, au bout d'un certain temps, favoriser la croissance tumorale: Rudolf Virchow en 1863 puis de nombreux auteurs ont documenté le lien entre un état d'inflammation chronique et le risque de néoplasie, dans les cancers cutanés (lien entre plaie chronique et cancer épidermoïde), gastriques (infection chronique à *Helicobacter Pylori*), hépatique (hépatites chroniques B et C et carcinome hépato-cellulaire), intestinales (maladie de Crohn et cancer colorectal, reflux gastro-oesophagien et adénocarcinome de l'oesophage), broncho-pulmonaire (bronchite chronique, silicose, asbestose et cancers du poumon), tandis que des hypothèses, actuellement moins étayées, ont été formulées pour une variété de néoplasies (comme l'adénocarcinome de prostate ou du pancréas) (14,15). On sait désormais que le microenvironnement tumoral inflammatoire sécrète des facteurs de croissance qui favorisent la survie tumorale, mais aussi des facteurs anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, des enzymes modifiant la matrice extracellulaire et pouvant faciliter la diffusion métastatique et la transition épithélio-mésenchymateuse, ainsi que des agents mutagènes (comme les dérivés actifs de l'oxygène) qui peuvent augmenter l'instabilité génétique et favoriser l'acquisition de mutations activatrices.

Ainsi, l'inflammation chronique, qui ne débouche pas sur une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, stimule la croissance tumorale, même si elle n'est pas la cause première de l'apparition d'une néoplasie.

Reprogrammation du métabolisme cellulaire

Les cellules normales, dans des conditions normales d'oxygénation et d'apport en sucre, dégradent le glucose en pyruvate (glycolyse) ce qui produit une faible quantité d'énergie (sous forme d'ATP) puis métabolisent le pyruvate dans les mitochondries au cours du cycle de Krebs, en présence d'oxygène, ce qui produit du CO₂ et une quantité d'énergie beaucoup plus importante (ratio d'ATP de 18:1 par rapport à la glycolyse). Les cellules tumorales, qui ont de plus grands besoins en énergie et doivent proliférer dans des tissus mal oxygénés à la néo-vascularisation anarchique, ont acquis la possibilité de modifier leur métabolisme pour tirer l'essentiel de leur énergie de la glycolyse, malgré son faible rendement en ATP. Ceci est réalisé en augmentant la captation du glucose, par exemple en surexprimant le récepteur GLUT1. Cette propriété est exploitée en imagerie diagnostique dans la TEP au 18-FDG: la séquestration intra-tumorale de glucose est suffisamment augmentée par rapport aux tissus normaux pour qu'il soit possible de visualiser directement des zones avides en injectant du glucose marqué par un isotope radioactif du Fluor. Cependant, cette reprogrammation du métabolisme n'est pas systématique et certaines tumeurs ne sont pas imagées correctement au 18-FDG (comme les tumeurs neuro-endocrines ou la majorité des adénocarcinomes de prostate, sauf les moins bien différenciés). De plus, il existe une hétérogénéité *spatiale* du métabolisme, avec certaines zones périphériques mieux perfusées continuant à utiliser le pyruvate et l'oxygène. Enfin, il existe possiblement une hétérogénéité *temporelle* avec des changements de régime entre l'un ou l'autre des métabolismes en fonction des contraintes énergétiques à un instant donné.

A ce jour, il n'existe pas d'intervention thérapeutique validée cherchant à exploiter la reprogrammation du métabolisme glucidique. L'utilisation du régime cétogène⁷ est une piste ancienne, explorée dans plusieurs essais cliniques, toujours en cours d'évaluation. Le caractère adaptatif du métabolisme tumoral placerait les interventions diététiques comme des options au sein d'une stratégie thérapeutique multimodale. Plusieurs essais en cours devraient permettre de clarifier ce point (16).

⁷ régime cétogène: basé sur des apports élevés en graisse, faibles ou très faibles en sucre (dans un ratio de 4:1 à 2:1 selon les auteurs), simule le métabolisme du jeûne (sans ses dangers) et pourrait créer un métabolisme défavorable à la croissance tumorale.

Echappement au système immunitaire

L'échappement au système immunitaire est le pilier émergent actuellement le plus exploré, par le nombre de molécules récemment autorisées et la masse des essais cliniques en cours. Ce travail lui consacre d'amples discussions. Cette revue générale des piliers de la cancérogénèse permet de mettre l'immunothérapie en perspective, en tant qu'une intervention thérapeutique adressant un pilier parmi d'autres. Elle permet de comprendre pourquoi les taux de réponse à l'immunothérapie en monothérapie sont relativement faibles et l'importance des combinaisons thérapeutiques.

Radiothérapie: généralités

Dans cette section sont donnés quelques éléments (définitions, techniques, concepts physico-biologiques) permettant d'appréhender cette discipline vaste située à l'intersection de la physique et de la médecine.

Rappels historiques

Les fondateurs

Wilhelm Conrad Rontgen (1845-1923)

Il est le découvreur des rayons X, en 1895, lorsqu'il remarque qu'un papier recouvert d'un matériau fluorescent peut se mettre à briller, sous l'effet d'un courant électrique dans un tube à vide. Il nomme ce rayonnement inconnu "X". Il découvre que ces rayons peuvent traverser les tissus et les organes mais sont arrêtés par les métaux: les premières radiographies médicales sont nées, elles servent aux chirurgiens pour repérer et extraire des corps étrangers (comme les balles d'armes à feu). Des applications médicales, à visée de traitement, sont aussi rapidement tentées, par exemple en Dermatologie (pour le Lupus) et en cancérologie. Röntgen reçoit le prix Nobel de physique en 1901.

Antoine Henri Becquerel (1852-1908)

Becquerel est le découvreur de la radioactivité naturelle: il identifie le lien entre la phosphorescence de l'uranium et les rayons X, en montrant que l'uranium produit en fait des rayons X. Il découvre également que ces rayonnements sont *ionisants* et que leur trajectoire n'est pas forcément une ligne droite, mais qu'elle peut-être déviée grâce à un champ électromagnétique. Becquerel est lauréat du prix Nobel de physique en 1903 avec Marie et Pierre Curie.

Marie (1867-1934) et Pierre Curie (1859-1906)

Marie Curie travaille initialement sur les rayons de Becquerel comme thésarde dans son laboratoire. Elle montre que ce rayonnement est une propriété intrinsèque de la matière, qu'elle appelle *radioactivité*, puis en collaboration avec Pierre Curie, ils identifient un élément particulièrement radioactif: le *polonium*, puis un autre plus puissant, le *radium-226*. Les applications en oncologie du radium-226 commencent dès

1903 pour les cancers utérins et les cancers de la peau, à peine 8 ans après la découverte initiale de Röntgen. Les époux Curie reçoivent en 1903 le prix Nobel de Physique avec Henri Becquerel.

Irène (1897-1956) et Frédéric Joliot-Curie (1900-1958)

Découvreurs de la radioactivité *artificielle*: la production d'isotopes radioactifs à partir d'atomes inactifs à l'état naturel, en les bombardant par des particules (1934). Ils imaginent la possibilité d'une réaction en chaîne et de leurs travaux naîtront des applications civiles et militaires: réacteurs à fission nucléaire et bombe atomique. Ils ont rendu possible la Médecine Nucléaire: la production et l'utilisation d'isotopes radioactifs à des fins d'imagerie diagnostique mais aussi de traitement.

Premières applications médicales en oncologie

A la fin du 19e siècle, il n'existe aucune thérapeutique anticancéreuse reconnue hormis la chirurgie. Si l'immunothérapie naît théoriquement dans les années 1890, avec les premières tentatives du Dr William Coley pour soigner grâce au système immunitaire (en injectant des pathogènes vivants ou atténués en intra-tumoral), ces démarches restent confidentielles et suscitent un fort scepticisme. A partir de 1895, plusieurs médecins ayant appris la découverte de Röntgen essayent ces "rayons X" chez des patients inopérables: des effets temporaires mais positifs sont obtenus, sans qu'à l'époque le mécanisme d'action ne soit compris (la nature des rayons n'est d'ailleurs pas encore élucidée).

Les deux premières décennies du 20e siècle sont le théâtre de nombreuses expérimentations, notamment en France, comme à l'institut du Radium à Paris (le futur institut Curie). Dès 1906, *Claudius Régaud* étudie le dosage et le fractionnement de la radiothérapie. En 1922, des cas de rémission de cancers du larynx sont présentés à Paris par *Henri Coutard*, obtenus par radiothérapie *exclusive*, sans recours à une chirurgie délabrante: ce sont les premiers protocoles de *préservation laryngée*. Les effets secondaires ont été contrôlés par le fractionnement du traitement en l'étalant sur plusieurs semaines: une innovation majeure, toujours utilisée aujourd'hui.

Cent ans plus tard, la radiothérapie n'a eu de cesse de chercher à préserver les organes et d'éviter une exérèse chirurgicale hasardeuse ou délabrante. Cette bataille concerne de nombreux organes (sein, oesophage, rectum, canal anal, vessie, prostate...)

où la place de la chirurgie a reflué en partie pour céder la place à des opérations moins lourdes ou parfois à des stratégies de préservation non chirurgicales.

La *Curiethérapie* (ou *brachythérapie*) qui consiste à implanter des isotopes radioactifs en intra-tumoral, initialement avec le radium-226, est expérimentée dès 1903 à Paris. De nombreux isotopes radioactifs seront ensuite développés grâce aux travaux d'Irène et Frédéric Joliot-Curie et permettront de développer la technique. Les implants actuels sont temporaires et peuvent être mobilisés avec un *projecteur de sources*.

La radiothérapie de *contact*, développée par Jean Papillon à Lyon à partir des années 1950, utilise un applicateur endocavitaire pour traiter des tumeurs ano-rectales, chez des patients bien sélectionnés chez qui la chirurgie présente un risque opératoire trop important (17,18).

Techniques de radiothérapie externe

Accélérateurs linéaires (LINAC)

Ce sont les machines actuellement les plus répandues, le premier modèle est développé en 1953 à Londres puis à l'université Stanford. Leur principe consiste à accélérer des électrons, d'une manière bien plus sophistiquée que dans le tube à vide de Röntgen.

Dans un LINAC, un champ électromagnétique à fréquence micro-ondes (quelques Mhz) produit un champ électrique dans lequel des électrons sont injectés. Ces électrons sont entraînés par le champ électrique, soit dans la direction axiale de propagation du champ électrique (*traveling wave design*) soit dans la direction orthogonale si le champ électrique est réfléchi pour former une onde stationnaire: dans ce cas les électrons sont accélérés dans les zones d'interférences constructives (*standing wave design*). Les LINAC peuvent produire des électrons dont l'énergie varie entre 4 et 25 MeV. Ces électrons accélérés sortent par une fenêtre de 2 à 3 mm de large et peuvent être convertis en rayonnement de photons X, en les dirigeant sur une cible en métal qu'ils bombardent⁸: l'impact produit un rayonnement de freinage (*bremsstrahlung*) sous forme de photons X lorsque les électrons perdent leur énergie cinétique. Le spectre du rayonnement de freinage est continu.

⁸ On peut traiter directement le patient avec des électrons (ou un mélange de photons X et d'électrons), si sa tumeur est située sur la peau ou seulement quelques mm en dessous. Les électrons perdent plus rapidement leur énergie dans la matière que les photons.

Le rayonnement de freinage n'est pas dirigé strictement en ligne droite, mais doit être dévié dans la direction longitudinale et son énergie doit également *homogénéisée*, par un filtre (*flattening filter*) qui peut être constitué de divers métaux en fonction de l'énergie du faisceau (plomb, tungstène, acier, aluminium).

Après être passé dans différents éléments, une partie du rayonnement a été absorbée, il faut mesurer l'énergie du rayonnement X dans une *chambre d'ionisation*. Dispositif classique pour mesurer la radioactivité, une chambre d'ionisation contient un gaz dont les molécules peuvent être ionisées lors du passage du rayonnement X: le comptage des molécules ionisées est effectuée grâce à la mesure du courant électrique qu'elles produisent lorsqu'elles traversent une anode et une cathode. La chambre d'ionisation permet de connaître le flux d'électrons généré, en *unités moniteur* (UM).

Les rayons X passent ensuite dans des *collimateurs multilames*. Leurs lames fines de quelques mm sont mobiles en permanence pour moduler leur temps d'ouverture et donc la dose. Aujourd'hui, la technique la plus répandue est l'arc-therapy (VMAT), où l'axe du rayonnement X décrit un cercle autour du patient, pendant que les lames du collimateur multilames bougent pour moduler la dose selon une quasi-infinité d'incidences. Ceci permet de délivrer une dose importante à la tumeur, tout en répartissant au maximum la dose aux organes à risque, augmentant ainsi la tolérabilité des traitements et permettant des escalades de dose.

Enfin, il faut savoir que les LINAC possèdent la capacité de réaliser de l'imagerie kilovoltage (kV-kV) et une acquisition scanographique (CBCT), grâce à leur source de rayonnement X. Cette imagerie embarquée est indispensable pour la radiothérapie moderne car elle permet le recalage précis de la cible, en comparant le scanner de traitement (CBCT) au scanner de planification.

On mentionne ensuite des machines un peu moins répandues mais très importantes en pratique clinique en raison de leurs caractéristiques techniques intéressantes.

Tomothérapie

Un LINAC dans lequel le patient est translaté perpendiculairement à l'anneau de traitement. Le rayonnement X décrit donc une hélice autour du patient (au lieu d'un cercle), ce qui permet une très bonne conformation de la dose mais aussi de traiter sur de plus grands volumes.

Cyberknife

Un accélérateur capable de traiter selon toutes les orientations, pour obtenir une excellente conformation de dose. Issu de l'évolution du gamma knife (une sphère composée de > 100 sources radioactives au Cobalt 60). Possède une capacité de suivi (tracking) automatique de la cible en temps réel, en comparant au scanner ou à l'IRM de planification sans intervention humaine, c'est un système de radiochirurgie robotisée..

IRM-LINAC

Le Viewray est le premier LINAC avec guidage IRM. L'IRM embarquée permet de visualiser les tissus plus précisément que le scanner. Elle permet de s'affranchir du placement de repères fiduciaires, de traiter selon des volumes plus réduits. A mesure que la communauté des oncologues-radiothérapeutes prend conscience des possibilités de la *radiothérapie adaptative*, de plus en plus de centres s'équipent.

Protonthérapie

L'utilisation des protons en radiothérapie est testée dès 1946, en raison de leur capacité à déposer leur énergie de manière plus focalisée que les photons: c'est le *pic de Bragg*, au-delà duquel l'énergie déposée par les protons est très faible. Cette propriété permet une meilleure épargne des tissus sains en arrière de la cible à traiter mais nécessite une précision meilleure encore dans la délinéation de la cible et l'administration du traitement. En France, seuls 3 centres sont équipés (Orsay, Nice, Caen). Cette technique nécessite un *cyclotron* ou un *synchrotron* pour la production et l'accélération des protons. Les protons sont accélérés à chaque passage dans un champ électrique, qu'ils traversent après chaque demi-cercle, obtenu grâce à un champ magnétique.

La radiothérapie interne : Curiethérapie

Définition et histoire de la Curiethérapie

La Curiethérapie (*brachythérapie* pour les anglo-saxons, du grec *brachy* : courte distance) consiste à placer des sources radioactives scellées au contact ou à l'intérieur de la tumeur. Cette technique permet d'obtenir une dose forte au sein de la cible avec une décroissance très rapide de la dose au-delà (variant comme l'inverse du carré de la distance, voir *dosimétrie*). La Curiethérapie permet donc une escalade de la dose tout en

épargnant les organes de voisinage. La conformité⁹ de la dose est excellente. Un placement très précis des sources radioactives est donc nécessaire pour éviter un sous-traitement d'une partie de la tumeur. Elle fut très largement employée après la découverte de la radioactivité naturelle, mais les améliorations progressives de la radiothérapie externe ont fait progressivement reculer la pratique dans la deuxième moitié du 20e siècle.

Si ses propriétés dosimétrique exceptionnelles l'ont sanctuarisée dans certaines indications (cancer du col utérin localement avancé, cancer de l'endomètre), elle est concurrencée par radiothérapie externe dans d'autres indications comme le cancer de la prostate, du sein, certains cancers ORL ou oesophagien, où son intérêt dosimétrique et médical est pourtant bien documenté. Paradoxalement, les pays avec un système de santé étatisé sont ceux où la Curiethérapie a le plus reculé, sous l'effet de remboursements insuffisants pour couvrir les frais (anesthésie, bloc opératoire, consommables, projecteurs de source, physiciens etc). Outre des moyens financiers et un plateau technique, elle nécessite une expertise, une formation spécifique, une appétence pour une technique de radiothérapie qui emprunte à la pratique chirurgicale et comporte des risques hémorragiques et infectieux.

Terminologie et techniques de Curiethérapie

La technique d'insertion *intracavitaire* consiste à placer temporairement un applicateur de source radioactive à l'intérieur d'une cavité naturelle ou opératoire située proche de la tumeur. Cette technique est utilisée en gynécologie, dans le traitement adjuvant de certains cancers de l'endomètre (applicateur intra-vaginal: vise à éviter les récurrences par extension de continuité au vagin), mais aussi dans certains cancers du sein (au sein de la cavité opératoire). Lorsque la cavité est naturelle (par opposition à chirurgicale), le terme plus spécifique d'insertion *intraluminale* est aussi employé.

La technique *interstitielle* consiste à implanter chirurgicalement plusieurs aiguilles creuses de petit diamètre au sein de la tumeur (ou d'organes de proximité si la tumeur a été enlevée chirurgicalement), ce qui permet le chargement ultérieur par des sources radioactives grâce à un système *projecteur* de source, après que l'opérateur et le

⁹ conformité de la dose: une mesure de l'adéquation entre la distribution de la dose et la géométrie de la cible traitée. Une conformité idéale est atteinte si une dose curative est administrée à la tumeur, tandis que les organes de voisinage ne reçoivent aucune dose. Ceci n'est jamais possible en pratique, mais les techniques de radiothérapie visent à maximiser la conformité de l'irradiation. Diverses formules mathématiques existent (les *indices de conformité*) pour une définition quantitative.

personnel sont sortis du bloc opératoire, ce qui limite leur exposition radioactive (technique d'*afterloading*). Dans ce cas, les sources radioactives sont placées *temporairement* dans le patient et à l'issue du traitement, elles sont ramenées au sein du projecteur de source.

Il est également possible d'insérer des implants actifs permanents, ce qui nécessite une expertise pour procéder précisément et rapidement à leur insertion afin de limiter l'exposition du personnel soignant.

Les *applicateurs de surface* sont placés directement sur la peau où ils forment un petit réseau, en utilisant un projecteur de source identique qui permet l'*afterloading*.

Principes physiques de la Curiethérapie

Les sources utilisées en Curiethérapie sont des isotopes radioactifs. Historiquement: le radium-226 (découvert par Marie Curie), abandonné depuis longtemps. Aujourd'hui, on utilise des isotopes plus pratiques, permettant de délivrer une activité importante dans de très petits volumes comme l'iridium-192, qui est adapté aux projecteurs de source, tandis que d'autres isotopes sont utilisés pour les implants permanents (iode-125).

La quantité de rayonnement ionisant dépend de plusieurs facteurs: la demi-vie (74 jours pour l'iridium-192) et donc l'âge de la source, l'activité (nombre de désintégrations par seconde) et l'énergie des différentes particules produites lors des désintégrations.

Le rayonnement produit est un mélange de particules élémentaires (rayonnement β et α), de photons de basse énergie et d'un rayonnement gamma (photons de haute énergie). La dosimétrie consiste à calculer la dose absorbée par les tissus au voisinage de la source. On suppose que la source émet des particules de manière isotrope en première approximation, ce qui cause une décroissance variant avec l'inverse du carré de la distance, cependant des corrections complexes sont utilisées dans les logiciels de planification. Des incertitudes existent sur le positionnement des aiguilles ou des implants, et sur la densité des tissus lorsqu'une planification ultrasonore est utilisée. Globalement, la Curiethérapie traite sur une profondeur réduite, comprise entre 3mm et 2 cm.

Débits de dose en Curiethérapie

Il existe trois grandes catégories de Curiethérapie, classées par débit de dose:

- à bas débit (LDR: Low Dose Rate), représentée par les implants permanents; le bas débit de dose correspond à une plage de 0.4 à 2 Gy / h. La grande majorité des données cliniques ont été établies avec du bas débit;
- à moyen débit (MDR: Medium Dose Rate): de 2 à 12 Gy/h;
- à haut débit (HDR: High Dose Rate): supérieur à 12 Gy /h.

On parle de Curiethérapie à débit de dose pulsé (PDR: Pulsed Dose Rate) lorsque qu'une source à haut débit (HDR) délivre plusieurs doses de courte durée, séparées par un intervalle de temps afin de reproduire un bas ou moyen débit de dose à partir d'une source à haut débit. La définition de l'unité de dose utilisée (ici le Gy: *gray*) est donnée dans la section suivante.

La dose en radiothérapie

On verra plus loin que la dose absorbée est fortement liée à la probabilité de contrôle tumorale et aux effets secondaires. Dans un service de radiothérapie, le rôle des physiciens et des dosimétristes est d'assurer que la dose prescrite par l'oncologue-radiothérapeute est délivrée correctement par la machine de traitement: en bonne "quantité" et au bon endroit. Il faut donc savoir *définir* quantitativement une dose absorbée, on présente donc brièvement le système d'unités avec la signification physique des *grandeurs* associées.

Le Gray

Dans un service de radiothérapie aujourd'hui, la dose est exprimée en Gray (Gy), avec par définition: **1 Gy = 1 Joule / kg**. Avec par définition 1 Joule = 1 N m.

Le *gray* mesure une *énergie absorbée* par le tissu. Les électrons créés par le rayonnement ionisant vont perdre leur énergie cinétique dans le milieu avec lequel ils interagissent. C'est ce transfert d'énergie cinétique qui permet de définir une quantité d'énergie absorbée. Avant d'être complètement stoppés, les électrons parcourent une certaine distance (qui dépend du milieu): leur énergie n'est donc pas libérée *ponctuellement*, mais au distribuée sur le trajet qu'ils parcourent. A l'échelle macroscopique, cela se traduit par une zone de *buildup*, présente sur les premiers mm dans le milieu, dans lequel l'énergie déposée est très faible. Puis, plus loin dans le milieu (après la profondeur de *buildup*), un équilibre électronique s'établit et l'énergie absorbée se stabilise.

Si idéalement, l'énergie déposée devrait être mesurée directement par calorimétrie, ceci est particulièrement complexe. En pratique, on utilise une chambre d'ionisation (ou *fantôme*), puis des facteurs multiplicatifs sont appliqués pour obtenir une énergie absorbée en Gy. D'autres méthodes de dosimétrie existent, comme la dosimétrie par film, qui rappelle l'expérience de Roentgen en 1895: l'énergie absorbée est estimée d'après le degré de noircissement sur un film photographique. D'autres méthodes exploitent la thermoluminescence de certains cristaux, qui transforment l'énergie absorbée en lumière, il existe également des méthodes utilisant des semi-conducteurs, ou des gels polymères...en pratique courante cependant, les *fantômes* sont les plus répandus.

Les mesures d'*activité*: curie, becquerel

Le *curie* et le *becquerel* (*unité du SI*) quantifient des désintégrations par unité de temps¹⁰. Ce sont des *activités* qui quantifient la *radioactivité*, elles sont donc beaucoup utilisées en médecine nucléaire, mais ne sont pas adaptées à la radiothérapie *externe*.

En Curiethérapie on utilise des implants d'isotopes radioactifs dont les désintégrations émettent, en sus d'autres particules, un rayonnement gamma, dont l'activité est mesurée en nombre de désintégrations par unité de temps.

Comme la radiothérapie externe et la Curiethérapie sont fréquemment utilisées en combinaison, leurs doses doivent être exprimées dans la même unité. Ainsi, les prescriptions de dose en Curiethérapie sont effectuées en *Gray*. Ces expositions sont converties pour spécifier le plan de Curiethérapie. On entrevoit donc la complexité que cachent des prescriptions de radiothérapie d'apparence simple, exprimées dans une unité, le *gray*, d'apparence familière à l'oncologue-radiothérapeute.

Mesure de dose efficace: Sievert

On rappelle l'existence d'une unité de dose *efficace*: le *Sievert*. Dans la même unité que le *gray* (Joules/kg), elle dépend d'un type de rayonnement et d'un tissu, on l'utilise en radioprotection. On l'obtient en multipliant l'exposition en *gray* par un facteur de correction propre à l'espèce animale et éventuellement à l'organe d'intérêt. Elle est utile pour quantifier des risques graves (exemple: décès par syndrome d'irradiation aiguë).

¹⁰ 1 curie (Ci) = le nombre de désintégration d'un gramme de radium-226 pendant 1 seconde.

1 becquerel (Bq) = une désintégration par seconde. 1 Bq = 2.7×10^{-11} Ci.

Le *sievert* n'est pas utilisé en radiothérapie car les effets biologiques sont estimés directement à partir de l'exposition en *gray*, organe par organe.

Quelques paramètres de dosimétrie en radiothérapie externe

On présente quelques paramètres de dosimétrie utiles à connaître pour l'oncologue-radiothérapeute. D'autres paramètres existent mais sont plutôt du domaine des physiciens (comme par exemple ceux décrivant la plus ou moins grande homogénéité du faisceau).

Percentage Depth Dose ou rendement en profondeur

Mesure la dose absorbée en fonction de la profondeur traversée dans un milieu. Exprimé en pourcentage d'une dose maximale exprimée à un point de référence situé à une certaine distance de la source de rayons X. C'est une fonction de plusieurs variables, et entre autres la profondeur. Elle est initialement croissante, sur la profondeur de build-up, puis devient décroissante plus ou moins rapidement. Elle dépend aussi de l'énergie des photons incidents: plus celle-ci est élevée, plus la PDD est élevée aux différentes profondeurs. Elle dépend aussi de la taille du champ utilisé (la PDD augmente avec la taille du champ).

Output Factor ou facteur d'ouverture collimateur (FOC)

Pour un champ d'une taille quelconque, c'est le ratio entre le débit de dose à la profondeur où l'énergie absorbée est maximale, divisé par le débit de dose d'un champ de traitement d'une taille égale à 10cm x 10cm. L'output factor vaut toujours moins de 1 lorsque le champ de traitement est plus petit que 10cm x 10cm. Il faut savoir que l'output factor diminue très fortement pour des petits champs en dessous de 4 cm x 4 cm. Cette diminution dépend de plusieurs facteurs, elle est complexe à quantifier de manière précise et ne peut pas être estimée avec une précision suffisante pour des champs inférieurs à 3 cm: les champs de taille inférieure doivent être traités en stéréotaxie.

Relations entre dose, efficacité et toxicité

On présente ici un résumé des effets radiobiologiques des rayonnements ionisants sur les tumeurs et les organes sains. On se limite à la radiobiologie de la radiothérapie *externe*.

Tissus à réponse (ou prolifération) rapide ou lente

Les tissus à prolifération *rapide* sont la tumeur et certains organes à renouvellement rapide, comme la peau, les muqueuses, l'intestin, la moëlle hématopoïétique. La durée de vie de ces cellules va de plusieurs jours à quelques semaines au maximum.

Les tissus à prolifération *lente* sont tous les autres organes. La durée de vie de leurs cellules peut être de plusieurs mois, parfois des années.

Une fraction des cellules est *stérilisée* après une irradiation, mais cette fraction ne meurt pas immédiatement: la mort cellulaire survient lors de la prochaine tentative de mitose (ou après quelques tentatives de mitoses entraînant des aberrations chromosomiques). Aucune réaction adverse ni repopulation ne se passe avant.

Les tissus à prolifération rapide donnent lieu aux réactions aiguës, dans les premières semaines avant l'irradiation (par convention, avant 3 mois) tandis que les tissus à prolifération lente peuvent subir des effets secondaires tardifs parfois des années après l'irradiation.

Une prolifération réparatrice survient donc au bout de quelques semaines de traitement (généralement dès la 2ème ou 3ème semaine) dans les tissus à renouvellement rapide, dits aussi à *réponse rapide*. Pour faciliter cette réparation et augmenter la tolérance, il faut augmenter l'étalement (durée totale) du traitement en diminuant la dose par fraction.

Pour les traitements dont la durée totale ne dépasse pas 2 ou 3 semaines, pratiquement aucune réaction aiguë n'a lieu *pendant* le traitement, la grande majorité survient *après*: augmenter la durée totale ne diminue alors pas les toxicités aiguës.

Les réactions aiguës sont aggravées par des doses par fraction plus élevées, mais dans des proportions moindres que les réactions tardives.

Les complications tardives sont assez fortement dépendantes de la dose par fraction, elles ne sont pas modifiées par la durée totale du traitement. Classiquement, elles sont diminuées par un intervalle de temps entre fractions supérieur à 6h (durée minimum pour une réparation des dégâts dans l'ADN), quand la dose par fraction est inférieure à 2

Gy, mais pour de plus fortes doses par fraction, cet intervalle doit être augmenté à 12 ou 18h et peut largement dépasser 24h en conditions stéréotaxiques.

Les complications sont aussi fortement dépendantes des volumes irradiés, pour les organes dits en parallèle: ceux qui sont composés d'unités fonctionnelles distinctes et qui peuvent fonctionner tant que suffisamment d'unités fonctionnelles sont opérationnelles (poumon, foie, rein, tube digestif, muqueuses). Pour les organes dits *en série*, la destruction de quelques unités fonctionnelles peut entraîner la perte de fonction (moëlle épinière). Certains organes ne sont pas classables dans l'une ou l'autre des catégories, comme le cœur, dont le myocarde est un organe parallèle, mais dont le système nerveux (responsable de la conduction) et les artères coronaires sont des organes en série.

Le modèle linéaire-quadratique (LQ)

La dose par fraction la plus couramment employée en radiothérapie externe, 2 Gy, stérilise environ 50% des cellules tumorales, sauf pour des cancers plus radiorésistants (glioblastome, mélanome, carcinome rénal, certains sarcomes).

Plus formellement, on estime que la fraction survivante S après une dose D (Gy) de radiothérapie, est donnée par l'équation:

$$\log_e S = -\alpha D - \beta D^2$$

Dans laquelle α représente la partie linéaire de la mort cellulaire et β la partie quadratique. On interprète ces deux paramètres en distinguant deux types de dommages différents:

α représente des dégâts *irréparables*, tandis que β représente les dégâts potentiellement *réparables* (cette réparabilité dépend de la nature des lésions, de leur nombre, de leur répartition plus ou moins groupée dans l'ADN et du temps laissé entre deux fractions pour réparer, ce qui rend complexe les interprétations *mécanistiques* du modèle LQ).

En effet, si l'on diminue la dose par fraction par 2, la composante linéaire est divisée par 2 tandis que la composante quadratique est divisée par 4. Si l'on double le nombre total de séance pour rétablir la même dose totale (tout en laissant au minimum 6h entre chaque séance pour permettre la réparation de l'ADN), la composante linéaire revient à

la valeur initiale mais la composante quadratique demeure divisée par 2: la composante linéaire représente donc des dégâts non diminués par le fractionnement.

Il s'agit en fait d'un modèle *phénoménologique*: les interprétations sur la nature exacte des dégâts cellulaires sont intéressantes pour discuter la validité du modèle mais leur connaissance n'est pas nécessaire pour l'utilisation du modèle.

Le modèle LQ est probablement faux aux très basses doses (inférieures à 0.2 Gy): certaines cellules pourraient être fortement sensibles à de faibles doses, du moins dans des modèles animaux (poumon, rein) (19). La courbe de survie de ces cellules serait de plus pratiquement plate de 0.2 à 1 Gy. Ceci relativise l'intérêt des interprétations mécanistiques trop poussées du modèle LQ. On se contentera de considérer qu'il décrit correctement les données au-delà de 1 Gy et jusqu'à environ 6 Gy par fraction, puis son réalisme diminue progressivement, possiblement à cause d'effets biologiques spécifiques aux hautes doses (comme des dégâts vasculaires).

Le ratio α / β est homogène à une dose (Gy) et représente la dose par fraction pour laquelle les deux composantes contribuent également à la mort cellulaire. Pour de nombreuses tumeurs, on estime que α / β vaut environ 10 Gy, tandis que certaines ont des α / β nettement inférieurs, comme des adénocarcinomes (prostate, sein), ou le mélanome.

On a mentionné que les tissus à réponse lente sont plus sensibles à la dose par fraction que les tissus à réponse rapide et les tumeurs. Ceci est décrit par un ratio α / β plus faible pour les tissus à réponse lente (donc un β plus fort et une composante quadratique plus importante). Cette propriété peut être mise à profit en fractionnant le traitement et en le prolongeant sur plusieurs semaines: ceci permet de protéger les tissus à réponse lente tout en délivrant une dose totale tumoricide (le premier à l'avoir démontré en clinique est *Henri Coutard* en 1922, pour le traitement des cancers du Larynx par radiothérapie exclusive).

Ainsi, pour l'adénocarcinome mammaire, le α / β tumoral a été estimé à 3.7 Gy tandis que pour les effets tardifs, le α / β a été estimé entre 1.7 Gy et 2.3 Gy, soit moitié moins. Ces estimations ont été réalisées en comparant efficacité et toxicité tardive dans un essai randomisé testant 2 fractionnements, l'un avec 2.7 Gy/fraction, l'autre avec 5.2 Gy/fraction (20). Cette valeur de α / β pour les effets tardifs tend à indiquer que l'augmentation des effets secondaires pourrait être rapide au-delà des 5.2 Gy/fraction,

sauf à diminuer fortement les volumes irradiés (avec une irradiation partielle en stéréotaxie ou en Curiethérapie).

Avec cette formulation du modèle LQ, on peut évaluer les effets de deux schémas de fractionnement en comparant les fractions survivantes. Par exemple, deux fractionnements A et B sont équivalents si et seulement si leurs fractions survivantes sont égales:

$$\alpha n_a D_a + \beta n_a D_a^2 = \alpha n_b D_b + \beta n_b D_b^2$$

Avec n et D dénotant les nombres de séances et la dose par fraction respective. On peut diviser par α chaque terme de l'équation et on voit que seul le ratio α / β importe pour comparer deux fractionnements.

Modèle LQ et doses équivalentes: EQD2 et BED

Ainsi, grâce au modèle LQ, on peut facilement exprimer l'efficacité d'un schéma de radiothérapie selon un schéma qui serait administré avec 2 Gy par fraction (la dose par fraction la plus courante). Cette dose équivalente est notée EQD2, elle vaut:

$$EQD2_{\alpha/\beta} = \frac{nD(1 + \frac{\beta}{\alpha}D)}{(1 + \frac{\beta}{\alpha}2)}$$

Par exemple, si $\alpha / \beta = 10$ (tissu à réaction rapide), une dose totale de 60 Gy en 20 fractions (3 Gy par fraction) a les mêmes effets biologiques qu'une dose de 65 Gy en 2 Gy par fraction (car $60 \times 1.3/1.2 = 65$). Mais pour un cancer de la prostate avec $\alpha / \beta = 3$, elle a les mêmes effets biologiques qu'une dose de 72 Gy en 2 Gy par fraction (car $60 \times 2/1.66 = 72$).

Pour l'oncologue-radiothérapeute qui a une grande expérience des traitements normofractionnés en 2 Gy par fraction, la dose équivalente EQD2 est très parlante.

Il existe une autre dose équivalente, la BED (Dose Biologique Efficace), à la définition plus abstraite, que l'on doit à John F. Fowler : c'est la dose équivalente si le traitement pouvait être administré de manière infiniment lente (ou fractionnée en très petites doses par fraction) qui permettrait de réparer toutes les lésions *réparables*. Dans cette hypothèse le terme quadratique (en β) disparaît. La formule de la BED vaut donc:

$$BED_{\frac{\alpha}{\beta}} = nD \left(1 + \frac{\beta}{\alpha}D \right)$$

C'est donc simplement le numérateur de la formule de l'EQD2, elle est mathématiquement très simple, mais moins naturelle pour beaucoup de praticiens. Elle est cependant très utilisée dans les publications.

Facteur temps et modèle LQ

Le facteur temps n'apparaît pas dans la formulation précédente. Ceci cache des hypothèses implicites.

Le modèle LQ suppose que chaque fraction est séparée de la suivante par un temps minimum permettant de réparer les dégâts dans l'ADN (de sorte que les paramètres de radio sensibilité puissent être constants dans le temps). En pratique, on considère qu'il faut au moins 6 heures, et plus probablement entre 12 et 18h lorsque des doses par fraction importantes sont utilisées¹¹.

Le modèle ne précise pas le débit de dose utilisé pour l'irradiation. Implicitement, il correspond aux débits de dose usuels en radiothérapie externe, où on délivre 2 Gy en 1 à 2 minutes. Cependant, la fraction survivante augmente quand le débit de dose diminue (les dégâts réparables sont plus souvent réparés), d'autant plus que la dose par fraction est élevée et que la proportion de dégâts réparables est importante (β grand donc α / β petit, donc pour les tissus à réaction lente, les adénocarcinomes et les tumeurs avec α / β faible) (21). Cet effet devient significatif pour les très hautes doses de radiothérapie externe (stéréotaxie) et la curiethérapie en haut débit de dose (éventuellement pulsée). Si des approches pragmatiques sont possibles (augmenter α / β pour des doses > 6 Gy, comme recommandé par John F. Fowler), il a été proposé des généralisations du modèle LQ assez élaborées, censées être valables pour tout débit de dose et toute dose par fraction, mais la complexité mathématique s'en trouve fortement accrue, comme par exemple la formule proposée par Wang et al (22).

La formulation suppose que la croissance tumorale reste constante au cours de la durée du traitement, qui s'étale sur quelques jours (pour la radiothérapie stéréotaxique) ou sur plusieurs semaines pour la radiothérapie classique (4 semaines pour la prostate, 6.5 semaines pour l'ORL, 3-4 semaines pour le cancer du sein). Cependant il existe une

¹¹ Le bi-fractionnement (2 doses dans la journée séparée d'au moins 6h) est bien toléré quand les doses sont inférieures à 2 Gy par fraction. En revanche, les essais de bi-fractionnement pour des doses supérieures ont montré des toxicités importantes, atténuées lorsque la dose est délivrée toutes les 18-24h.

accélération de la croissance tumorale au bout de quelques semaines de traitement: la *repopulation accélérée*.

Avant tout traitement, le temps de doublement d'une tumeur est souvent de l'ordre de quelques mois. En revanche, son temps de doublement *potentiel* (Tpot) est beaucoup plus court (quelques jours). Le temps de doublement *potentiel* est estimé en divisant la durée du cycle cellulaire par la proportion de cellules en prolifération. Ainsi, si une cellule tumorale se divise en 6 heures, mais que "seulement" 15% des cellules prolifèrent, la tumeur double de taille en $6 / 0.15 = 40$ heures¹². Cependant, en raison d'une inadéquation entre les apports vasculaires et les besoins pour maintenir ce taux élevé de doublement, la très grande majorité des cellules tumorales meurt par apoptose (jusqu'à près de 99%), surtout au coeur de la tumeur loin de la néovascularisation tumorale périphérique. Ainsi, si 95% des cellules meurent, le temps de doublement devient $40 / 0.05 = 800$ heures, soit environ 1 mois.

Après un certain nombre de séances de radiothérapie, la diminution de la densité de cellules diminue la pénurie de ressources ainsi que le taux de perte spontané. En conséquence, le temps de doublement diminue fortement pour se rapprocher du temps de doublement potentiel Tpot.

On estime que le moment où cette accélération débute peut être aussi court que 1 à 2 semaines après le début du traitement, ou survenir jusqu'à la 4e semaine (2,23).

En conséquence, le modèle LQ peut nécessiter des adaptations pour des traitements prolongés, dont l'étalement dépasse une durée de *kick-off*, notée Tk. Une adaptation du modèle consiste à supposer que, au-delà de Tk, le temps de doublement effectif prend une valeur Teff généralement légèrement supérieure ou égale à Tpot. Les valeurs expérimentales de Tpot varient d'un facteur 10 selon les tumeurs, typiquement entre 2 et 25 jours, avec une médiane de 5 jours. On peut choisir une valeur proche de la médiane Teff = Tpot = 5 jours.

Le modèle LQ devient alors, pour $T > T_k$:

$$\log_e S = -\alpha D - \beta D^2 + \log_e 2 \left(\frac{T - T_k}{T_{eff}} \right)$$

¹² Ce calcul suppose que 15% des cellules doublent en 6h, puis que les cellules ainsi créées arrêtent de cycler (entrée en phase G0), puis 6h passent pour que 15% d'autres cellules doublent à leur tour, etc. Il faut donc $6 / 0.15 = 40$ h pour que toutes les cellules aient doublé. Ce calcul suppose que la proportion de cellules en cycle est constante, donc que les cellules cancéreuses sont homogènes. On peut évidemment imaginer des modèles plus complexes avec de l'hétérogénéité tumorale.

L'efficacité du traitement diminue donc fortement après que la repopulation a commencé. Si une dose par fraction de 2 Gy tue 50% des cellules et que le temps de doublement T_{eff} est de 7 jours, on voit qu'il faut un supplément de dose de 2 Gy par semaine pour compenser la repopulation accélérée. Si la repopulation commence trop tôt, ou que T_{eff} est trop court, la dose nécessaire peut être impossible à délivrer et aucun contrôle tumoral n'est possible.

Limites du facteur temps dans le modèle LQ

Cependant, même si l'on pourrait mesurer le temps de doublement potentiel T_{pot} chez un patient, sa valeur prédictive sur le contrôle local n'a jamais pu être établie. Il n'est pas certain que cette grandeur et les autres paramètres (α , β) soient stables dans le temps¹³, ni que leur estimation ponctuelle par biopsie soit suffisamment fiable. Il est également probable que d'autres paramètres soient également à prendre en compte et que ceci ait pu obscurcir le rôle du T_{pot} , surtout dans des séries rétrospectives. Après plusieurs résultats décevants, comme ceux de l'institut Gustave Roussy (24), l'intérêt pour la mesure de T_{pot} a disparu. Ce concept garde probablement une validité d'ordre général et met en garde l'oncologue-radiothérapeute contre les interruptions et les allongements de l'étalement du traitement, dont l'effet délétère a été prouvé (25). Sa pertinence est également à relativiser dans le contexte actuel de traitements hypo fractionnés dont l'étalement ne dépasse pas 3 à 4 semaines (sein, prostate).

Les recherches actuelles s'orientent plutôt vers des agents radiosensibilisants (26) pour augmenter globalement la radiosensibilité de tous les patients.

On peut également se demander si la repopulation accélérée, le temps de kick off, le T_{pot} ont toujours une signification en radiothérapie stéréotaxique où le traitement ne dure que quelques séances. De plus, la stéréotaxie utilise de fortes doses par fractions, et une partie de son efficacité pourrait résulter d'une "nouvelle radiobiologie" impliquant en particulier des *dégâts vasculaires*: se pourrait-il que ces dégâts vasculaires limitent le phénomène de repopulation tumorale (puisqu'elle serait liée à une meilleure perfusion) ? Des compléments de dose en stéréotaxie pourraient-ils aider à lutter contre la repopulation tumorale (sous réserve d'une méthode de sélection des patients encore à définir) ?

¹³ Il est possible que la radiosensibilité de la tumeur augmente à mesure que son volume réduit, du fait d'une meilleure oxygénation (hypothèse de sensibilisation par l'irradiation de Bergonié). Ceci pourrait s'opposer à l'effet de la repopulation accélérée donc diminuer l'importance du T_{pot} .

En pratique, le modèle LQ est souvent utilisé dans sa forme la plus simple sans prise en compte du facteur temps. Ceci ne doit pas faire oublier l'existence de la repopulation accélérée et son lien avec l'étalement du traitement (ou éventuellement avec la réduction du nombre de cellules tumorales).

Mécanismes d'efficacité de la radiothérapie

Radiobiologie "classique": les 4 Rs

La forme simple du modèle LQ ne dispense pas l'oncologue-radiothérapeute de chercher à connaître les mécanismes moléculaires et biologiques de la radiothérapie. En effet, si l'on peut "faire de la radiothérapie" en utilisant le modèle LQ, dès que l'on aborde le domaine de la recherche, les limites de validité du formalisme peuvent être rapidement franchies: doses par fraction élevées ($> 6-8$ Gy), nouveaux agents radiosensibilisants ou radioprotecteurs, combinaisons avec des thérapies nouvelles ciblant des voies de signalisation cellulaire et de nombreuses autres situations innovantes sont "hors modèle", l'oncologue-radiothérapeute doit alors connaître les mécanismes fondamentaux pour s'orienter.

Redistribution dans le cycle cellulaire après irradiation

Les cellules sont plus ou moins radiosensibles selon leur position dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire voit se succéder les phases M (mitose), G1 (croissance, synthèse des acides aminés, sortie éventuelle du cycle vers la dormance, notée G0), S (synthèse de l'ADN), G2 (synthèse des protéines et organelles) puis à nouveau M, etc. Les phases G1, S sont moins radiosensibles que les phases G2, M. Aussi, une irradiation tend à sélectionner des cellules en phase G1, S (radiatorésistantes). Il est donc théoriquement bénéfique d'attendre plusieurs heures avant la prochaine irradiation pour que ces cellules se distribuent dans les phases plus radiosensibles. La réalité est plus complexe: les tumeurs peuvent se régénérer à partir de cellules en G0 qui ne cyclent pas. Il est possible que les irradiations répétées finissent par tuer suffisamment de cellules tumorales pour que les cellules en G0 se remettent en cycle et deviennent radiosensibles. Au final, il n'existe pas d'intervalle de temps particulièrement "optimal" entre deux fractions pour tirer parti du phénomène de redistribution dans le cycle cellulaire.

Rôle de l'oxygène et ré-oxygénation

Dès le début du 20ème siècle on découvre que les tissus mal perfusés sont moins touchés par les effets des rayonnements ionisants. On démontre dans les années 1950 que l'oxygène est un agent radiosensibilisant, du fait de sa forte affinité électronique. Le ratio de la dose pour produire le même effet biologique dans un tissu hypoxique que dans un tissu normoxique est de l'ordre de 3 (OER: Oxygen Enhancement Ratio). Le rôle délétère de l'anémie a été démontré dans la radiothérapie des cancers ORL. Des agents radiosensibilisants ont été développés pour imiter les propriétés de l'oxygène mais avec une meilleure pharmacocinétique (classe des imidazolés, dont le très connu *métronidazole*, également un antibiotique et antiparasitaire).

La radiothérapie a possiblement des effets vasculaires par destruction des cellules endothéliales mais son effet net est difficile à prédire: hypoxie transitoire par destruction de la néovascularisation, mais aussi lutte contre l'hypoxie par réduction de la densité de cellules tumorales et par stimulation d'une angiogenèse plus efficace. De hautes doses pourraient provoquer des effets vasculaires entraînant directement la mort cellulaire (en particulier en radiothérapie stéréotaxique) (27).

Au final, la ré-oxygénation de la tumeur, au cours d'une irradiation fractionnée (à faible dose), est l'un des mécanismes considérés comme fondamentaux de l'efficacité de la radiothérapie. Cette loi est à relativiser pour les traitements stéréotaxiques, pour lesquels sa validité n'est pas évidente (très peu de fractions, très haute dose avec dégâts vasculaires potentiellement importants).

Repopulation

Elle a été évoquée dans le modèle LQ, dans la version avec le facteur temps.

Réparation

Les dégâts cellulaires de rayonnements ionisants sont multiples et ne se limitent pas à la dichotomie entre lésions réparables ou irréparables qui sous-tend le modèle LQ.

Tous les éléments cellulaires sont susceptibles d'être endommagés (membranes, mitochondries...), et pas seulement l'ADN du noyau. Pour l'ADN, les rayons X entraînent des clusters de lésion double brins très rapprochés, étendues sur de nombreuses paires de base. Ces dégâts sont difficilement réparables, leur proportion augmente avec la dose

par fraction, tandis que les autres dégâts à l'ADN plus simples (comme les lésions simples brins), sont potentiellement réparables mais peuvent se transformer en lésion double brin si le brin d'ADN est dupliqué lors d'une mitose.

Les systèmes de réparation de l'ADN ont des cinétiques très différentes selon que la réparation est non-homologue (rapide, ne dépend pas de la position dans le cycle cellulaire, avec beaucoup d'erreurs) ou homologue basée sur l'autre chromosome (lente, uniquement possible en phase S ou G2, fiable).

Il est difficile de savoir si une durée de 24h entre deux fractions permet une réparation *ad integrum* de l'ADN dans les tissus sains. Il est probable que la durée de 6h entre deux fractions (utilisée en hyperfractionnement avec 2 séances par jour) n'est pas suffisante pour une réparation complète de l'ADN, même si elle permet une récupération tissulaire.

En cas de combinaison de la radiothérapie avec des agents inhibant la réparation de l'ADN, comme les désormais célèbres inhibiteurs de PARP, une forte potentialisation des effets de la radiothérapie est à anticiper, du point de vue de l'efficacité mais aussi des effets secondaires; on suivra par exemple avec intérêt les données de toxicité du prochain essai OLA-TMZ-RTE-01 dans le Glioblastome, où la combinaison radiothérapie externe, chimiothérapie alkylante par Temozolomide et inhibiteur de PARP (olaparib) sera évaluée avec une escalade de dose progressive (28).

Cytotoxicité directe

Les mécanismes d'action de la radiothérapie sont multiples, leur élucidation est un processus progressif et toujours en cours. Historiquement, seule l'action cytotoxique de la radiothérapie a été considérée et l'augmentation de la dose délivrée à la tumeur a été, et demeure, l'objectif prioritaire, combinée à l'épargne des organes de voisinage. Cette conception alimente les évolutions technologiques, comme la radiothérapie en conditions stéréotaxiques. De fait, l'escalade de dose a permis d'obtenir des améliorations importantes dans le contrôle local pour un grand nombre de cancers (29).

Cette cytotoxicité passe vraisemblablement par des dégâts irréparables dans l'ADN, causés directement par le rayonnement ionisant ou indirectement par la production de dérivés réactifs de l'oxygène, qui génèrent un stress oxydatif responsable de mort cellulaire qui peut être soit programmée - par apoptose - (30), soit non physiologique - par nécrose - (31). La part relative de l'apoptose et de la nécrose n'est pas connue; elle

dépendrait de mécanismes moléculaires complexes et peut-être de la dose: l'apoptose pourrait prédominer aux "faibles" doses et la nécrose serait prépondérante aux "fortes" doses(32), où des dommages vasculaires sont également réputés apparaître(33). La nécrose serait également plus immunogène que l'apoptose.

Certains auteurs complètent le tableau des différentes morts cellulaires avec plusieurs types intermédiaires entre l'apoptose et la nécrose: mort cellulaire par autophagie, par nécroptose, par pyroptose, qui diffèrent par le degré d'inflammation (34). Leur contribution respective dans la radiothérapie est encore inconnue.

Rôle du système immunitaire

Le rôle du système immunitaire dans l'efficacité de la radiothérapie a été soupçonné dès le début du 20ème siècle, lorsqu'il était évoqué un possible effet de "*radiovaccination*". Mais l'intérêt des chercheurs se porte quasi exclusivement sur la dose et sa cytotoxicité pendant de nombreuses décennies.

La contribution de l'immunité à la radiothérapie connaît un regain d'intérêt à partir des années 1970, par la mise en évidence d'une radiocurabilité dépendant de l'immunocompétence de l'hôte dans certains modèles animaux (35). Ces travaux s'inscrivent à l'époque dans un mouvement de redécouverte du rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs (36,37), trois quart de siècle après la découverte de l'immunothérapie par le Dr William Coley (38), qui fut éclipsée durant la majeure partie du 20ème siècle par les succès de la radiothérapie puis de la chimiothérapie.

Les mécanismes du lien entre radiothérapie et contrôle tumoral passeraient aussi par l'induction d'une mort cellulaire qui est *immunisante* contre les antigènes de la cellule mourante (ICD: immunogenic cell death). Cette immunisation nécessite la stimulation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de certains antigènes, activés par l'action des cellules présentatrices d'antigène et des macrophages, qui sont recrutés par l'activation de mécanismes moléculaires radio-induits conduisant à l'expression de plusieurs signaux de dommage moléculaires (DAMPs: Damage Associated Molecular Patterns).

Pour certains auteurs, la radiothérapie pourrait également contribuer à un processus de normalisation vasculaire, qui restaurerait un gradient de perfusion tissulaire efficace et faciliterait l'infiltration du stroma par le système immunitaire (39,40).

Des précisions sur les voies de signalisation moléculaire nécessitent au préalable des rappels d'immunologie et sont donc données plus loin dans la section sur l'immuno-radiothérapie.

Mécanismes de résistance

Les cellules possèdent des mécanismes moléculaires de protection contre l'apoptose et les cellules cancéreuses les exploitent pour résister à la radiothérapie. Ainsi, le phénomène de repopulation tumorale est connu depuis les années 1960. Pour les cellules normales, la repopulation est un mécanisme de réparation nécessaire à la restauration des tissus après exposition aux rayonnements ionisants. Mais pour les tumeurs, le temps de doublement tumoral diminue drastiquement et passe de quelques mois avant traitement, à quelques jours seulement, selon des mécanismes mal élucidés, après quelques semaines de traitement (41). Le développement de schémas de radiothérapie plus courts (avec hypofractionnement modéré puis extrême) a contribué à diminuer son importance, probablement sans l'éradiquer complètement (voir discussion précédente sur le modèle LQ et la prise en compte du facteur temps).

L'existence de cellules souches du cancer, qui seraient particulièrement radorésistantes et chimiorésistantes, est un sujet étudié depuis plusieurs décennies, et constitue un débat non tranché (42)¹⁴.

Toxicités de la radiothérapie

Lien entre doses, volumes et toxicités

La toxicité pour les organes de voisinage est liée aux volumes et aux doses d'irradiation. Grâce à la planification tridimensionnelle sur scanner, apparue à partir de la fin des années 1980, le calcul des histogrammes dose-volume et le respect de contraintes associées permettent de mieux maîtriser la fréquence des complications. Avant cette planification tridimensionnelle, l'oncologue-radiothérapeute devait estimer les volumes d'organes sains irradiés et les doses reçues, de manière approximative à partir de radiographies.

A partir du début des années 1990, des recommandations précises sont publiées sur les limites de dose et de volume par organe et permettent une quantification précise du

¹⁴ L'augmentation globale des taux de contrôle local avec l'escalade de dose a aussi fait reculer les préoccupations sur l'existence de cellules intrinsèquement radorésistantes.

risque de complication: Emami et al publient le premier référentiel en 1991 (43), actualisé à partir de 2007 par le groupe de travail QUANTEC (quantitative analysis of normal tissue effects in the clinics). Pour homogénéiser les définitions des complications tardives, un système d'évaluation précis des effets tardifs des radiations ionisantes est proposé en 1997: l'échelle SOMA-LENT (44).

Aujourd'hui, les techniques modernes de radiothérapie externe (IMRT, VMAT) permettent une meilleure conformité de dose et réduisent les toxicités par rapport aux recommandations de 1991. Ces limites de dose sont valables pour des doses par fractions d'environ 2 Gy. Le modèle LQ permet d'extrapoler pour des fractionnements différents, dans certaines limites de dose par fraction déjà discutées.

Les techniques de stéréotaxie délivrent des doses par fraction plus élevées et permettent de réduire fortement les volumes irradiés grâce à de forts gradients de dose (de l'ordre de 10% pour 1 mm). Comme ces techniques sont plus récentes, les modèles statistiques de dose / volume / toxicité sont moins abondants et l'extrapolation des données entre divers fractionnements est plus hasardeuse.

Les toxicités de la radiothérapie peuvent être fortement augmentées en cas de traitement concomitant par chimiothérapie, thérapie ciblée ou immunothérapie. Réciproquement, les toxicités des traitements systémiques peuvent aussi être potentialisés par la radiothérapie. Dans ce travail, on présentera en détail les données les plus récentes sur les immunothérapies.

Aussi, malgré les améliorations techniques, les toxicités demeurent un facteur limitant majeur qui empêche d'atteindre des taux de guérison élevés. Si l'on a coutume de les exposer *après* les mécanismes d'efficacité, en pratique *clinique* les toxicités restent au premier rang des préoccupations de l'oncologue. Ainsi, des associations théoriquement séduisantes avec la radiothérapie ont parfois conduit à des toxicités intolérables: gemcitabine ou bevacizumab, en particulier.

Toxicités aiguës et tardives

On a vu que les tissus sont traditionnellement classés en fonction de leur *turnover* cellulaire lent ou rapide et que celui-ci impacte le délai entre l'irradiation et l'apparition des effets secondaires. Cette explication semble convenable pour les toxicités aiguës (survenant moins de 2 ou 3 mois après le début de la radiothérapie): en effet, le délai de

survenue est cohérent avec la durée de vie des cellules concernées (peau, muqueuse, intestin).

En revanche, la physiopathologie des toxicités tardives ne peut pas être expliquée uniquement par un turnover lent, surtout quand ces effets secondaires surviennent plusieurs années après la radiothérapie. Il faut tenir compte des effets de la radiothérapie sur plusieurs types de cellules, impliquant les tissus de soutien, une désorganisation microvasculaire contribuant à une hypoxie tissulaire, un oedème vasogénique par fuite capillaire, des effets pro-inflammatoires et des processus cicatriciels selon un mode auto-entretenu impliquant des voies de signalisation moléculaire en cours d'élucidation (comme la voie TGF- β). Ainsi les dégâts dans l'ADN ne seraient que l'évènement déclencheur initial qui, dans certaines conditions, peut provoquer une réaction inflammatoire chronique sur plusieurs années.

Pour certains auteurs, cette inflammation chronique pourrait produire des effets hors du champ d'irradiation initial, comme dans une version *en négatif* de l'effet "abscopal" de la radiothérapie que nous décrivons plus loin¹⁵. Pour une revue des mécanismes physiopathologiques, on pourra lire (45). Un exemple est la fibrose pulmonaire radio-induite, intéressant parfois des territoires pulmonaires non irradiés.

Les toxicités tardives sont non seulement liées à la dose totale, mais également à de fortes doses par fraction et aux volumes d'irradiation, ce qui justifie l'adhésion aux bonnes pratiques de radiothérapie et au respect des contraintes de dose / volume, mais aussi de chercher à minimiser ces volumes d'irradiation par l'adoption des techniques innovantes (actuellement, développement de la radiothérapie guidée par l'IRM par exemple) ou en ayant recours à la Curiethérapie à chaque fois que cela est possible.

¹⁵ L'effet abscopal décrit une action anti-tumorale à distance du champ d'irradiation, probablement médiée par le système immunitaire; cet effet tend à être observé de manière non rare en cas de combinaison avec les immunothérapies (voir infra).

Immunothérapie: généralités

Il est nécessaire de présenter les grandes lignes du fonctionnement du système immunitaire, sinon une description exhaustive. On présentera l'immunité innée, l'immunité adaptative puis l'on précisera les cibles moléculaires d'un certain nombre d'immunothérapies du cancer, avec une place prépondérante laissée aux inhibiteurs de checkpoints (les plus répandus en tumeurs solides), en mentionnant aussi les CAR-T cells utilisées en hématologie.

Aspects historiques

Il existe depuis plusieurs siècles des rapports anecdotiques de patients atteints de cancer qui ont vu leur tumeur régresser temporairement, ou apparemment disparaître, à la suite d'un épisode infectieux sévère. Le médecin allemand Friedrich Fehleisen (1854-1924) identifie vers 1883 la souche bactérienne responsable de l'Érysipèle, une infection des tissus sous-cutanés: le *streptococcus pyogenes*. Le Dr Fehleisen pense qu'il existe un lien entre cette infection et certains de ces cas de régression tumorale. Vers 1891, le Dr William Coley (1862-1936), un chirurgien américain, a observé un cas spectaculaire de régression tumorale post-infectieuse (le patient est vivant et sans tumeur plusieurs années après) et il se lance dans un recensement systématique des cas: il collecte 46 cas cliniques documentés et s'en inspire pour définir la première méthode connue pour avoir induit artificiellement une réponse immunitaire anti-tumorale: d'abord avec une souche vivante de *streptococcus pyogenes*, puis, en raison des toxicités trop importantes, avec un mélange de bactéries inactivées nommées "toxines de Coley". Avec ces moyens primitifs, il rapporta un taux de réponse (personnel) d'environ 20% et quelques longs répondeurs. S'il est souvent considéré aujourd'hui comme le père de l'immunothérapie, il fut violemment dénigré par ses confrères. Le mécanisme d'action alors largement inconnu, les effets secondaires importants, le risque infectieux, le caractère imprédictible des réponses, la non standardisation des "toxines", représentaient des handicaps face à la radiothérapie alors émergente, ou la chirurgie. Des personnalités influentes, comme son collègue le Pr James Ewing (1866-1943), par ailleurs fervent promoteur de la radiothérapie aux USA, prennent alors publiquement position contre les travaux de Coley. Tous ces vents contraires interrompent la progression du domaine jusque dans les années 1945-1950, où les

découvertes fondamentales dans le domaine de l'immunologie vont apporter de la crédibilité scientifique à l'immunothérapie des cancers: découverte de l'interféron en 1957, du rôle des lymphocytes T en 1967, des cellules dendritiques en 1973, des cellules natural killer en 1975, de l'interleukine 2 en 1976. En parallèle, les travaux sur la transplantation d'organes produisent aussi des découvertes majeures, comme le complexe majeur d'histocompatibilité en 1948.

En 1976, on utilise pour la première fois le vaccin contre la tuberculose (BCG) en instillation intravésicale pour traiter les cancers de la vessie à des stades précoces, dans une stratégie adjuvante, après exérèse complète: c'est un succès et une confirmation des expérimentations historiques de Coley.

En 1991, on autorise pour la première fois l'utilisation de l'interleukine 2 dans le cancer du rein métastatique puis dans le mélanome métastatique en 1998. Les taux de réponse sont relativement faibles (15-16%)¹⁶, ils nécessitent des doses élevées génératrices d'effets secondaires, mais l'on observe quelques réponses très longues (jusqu'à plusieurs années).

L'immunothérapie "moderne" des inhibiteurs de checkpoint naît progressivement à partir de 1983 avec l'identification du récepteur antigénique des cellules T: le TCR, dont la structure permettra de comprendre progressivement par quels mécanismes la réponse immunitaire anti-tumorale peut être activée ou empêchée. Ainsi, le premier "checkpoint" *inhibiteur* est découvert vers 1987: le CTLA 4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen number 4). Plus d'une décennie plus tard, en 2011, le premier bloqueur de checkpoint inhibiteur est autorisé dans le mélanome métastatique: l'ipilimumab, premier anti CTLA 4. En 2014, le premier bloqueur d'un autre checkpoint inhibiteur est approuvé: le nivolumab, premier anti-PD1 et membre d'une prolifique famille qui constitue désormais la colonne vertébrale des immunothérapies modernes (prix nobel de médecine 2018 pour Tatsuko Honjo et James P. Allison, pour leur découverte respective de PD-1 et CTLA 4).

Les vaccins anti-cancer ont été expérimentés depuis longtemps mais n'ont pour le moment pas encore trouvé leur place en clinique, (malgré l'autorisation du Sipuleucel T dans le cancer de prostate métastatique, qui a déçu par la suite); des stratégies de combinaison vaccinale avec les inhibiteurs de checkpoint sont actuellement à l'étude.

¹⁶ Proleukin prescribing information, site web FDA.

Les cellules T à récepteur chimériques ciblent des antigènes tumoraux spécifiques et ont été approuvés pour la première fois en 2017 pour les LAL B pédiatrique, depuis elles se développent dans les hémopathies malignes, mais pour le moment sans succès dans les tumeurs solides (46).

Avant d'entrer plus en détail dans le fonctionnement des inhibiteurs de checkpoint, on commence par des rappels sur le système immunitaire.

Présentation du système immunitaire

Le système immunitaire est l'ensemble des cellules dont la fonction est de débarrasser l'organisme des pathogènes (bactéries, virus, parasites, champignons) et de leurs éventuelles toxines, mais aussi d'éliminer les cellules compromises, en particulier les cellules cancéreuses. Le système immunitaire possède deux lignes de défense: l'immunité innée et l'immunité adaptative, qui agissent en collaboration, avec des stimulations réciproques.

Immunité innée

L'immunité innée est activée en quelques minutes, elle n'a aucune "mémoire" des pathogènes qu'elle rencontre et agit de manière stéréotypée. Elle repose sur un ensemble de cellules, certaines protéines de signalisation (cytokines) et sur un ensemble de protéines à fonction cytotoxique: le système du *complément*.

La fonction principale de l'immunité innée est le recrutement de cellules immunitaires sur un site d'infection ou d'inflammation. Ces cellules produisent des cytokines (petites protéines utilisées pour la communication de cellule à cellule) pour envoyer des messages afin de recruter sur site les différents effecteurs immunitaires. Leur action permet également d'activer le *système du complément*, une cascade de réactions biochimique qui vise à recouvrir la cible de protéines qui faciliteront la *phagocytose* ou qui détruiront directement la membrane cellulaire de la cible (par formation du *complexe d'attaque membranaire*).

Les cellules de l'immunité innée peuvent aussi servir à amorcer la réponse immunitaire adaptative, par le mécanisme de la présentation antigénique (voir infra).

On peut essayer de classer les nombreuses cellules impliquées dans l'immunité innée ainsi:

macrophages et *neutrophiles* sont tous capables de phagocytose, mais seuls les macrophages sont capables de *présentation antigénique* (aux lymphocytes T) et vivent plus longtemps (mois, années) que les neutrophiles (durée de vie quelques jours). Les macrophages modifient leurs caractéristiques selon le tissu. Ainsi, dans le microenvironnement tumoral, certains sont *associés à la tumeur* (ils “collaborent” activement avec les cellules cancéreuses, ne les phagocytent pas, jouent un rôle immunosuppresseur et tiennent “à distance” l’immunité adaptative), ce phénotype est noté “M2”, leur acronyme TAM (*tumor associated macrophages*). Les macrophages ayant conservé leurs caractéristiques anti-tumorales sont dits “M1”. Une tumeur aurait tendance à “corrompre” les macrophages M1 en les transformant en M2.

Les *cellules dendritiques* sont capables de phagocytose et de présentation antigénique aux lymphocytes T, elles sont proches fonctionnellement des *macrophages*, mais en diffèrent par leur morphologie, peut-être aussi par leurs progéniteurs.

Les *cellules NK* (Natural Killer) jouent un rôle important dans la lutte anti-tumorale et les cellules infectées par des virus, en produisant des *perforines* (qui percent la membrane cellulaire) puis en injectant des *granzymes* (type de protéase) qui induisent la mort cellulaire programmée (*apoptose*). Elles possèdent l’importante propriété d’éliminer certaines cellules capables d’échapper à l’immunité adaptative (voir infra).

Mastocytes et *basophiles* sont capables de dégranulation (relargage d’un contenu cellulaire pro-inflammatoire comme l’histamine) et sont impliqués dans les réactions allergiques et l’asthme. Les éosinophiles luttent contre les parasites. Le rôle des *mastocytes*, *basophiles* et *éosinophiles* dans le contrôle anti-tumoral n’est, s’il existe, pas encore compris.

Immunité adaptative

L’immunité adaptative nécessite entre quelques heures ou quelques jours pour agir, elle dispose d’une mémoire immunitaire qui lui permet de se réactiver plus fortement après un certain nombre de rencontres avec un même pathogène. Elle s’établit en cas d’échec de l’immunité innée à détruire complètement le pathogène initial. On dit qu’elle sait distinguer le *soi* du *non-soi*, une expression qui évoque les origines de sa découverte: les causes du rejet des greffes d’organes.

L’immunité adaptative repose sur seulement deux types de cellules: les *lymphocytes T* et les *lymphocytes B*, mais ses mécanismes d’action sont sophistiqués. Les cellules de

l'immunité innée à fonction de présentation d'antigène (APC: Antigen Presenting Cells) servent de médiatrices entre les deux types d'immunité, plus spécifiquement entre les APC et les lymphocytes T.

Les lymphocytes T expriment à leur surface de nombreux clones d'un même récepteur, le TCR (T-Cell receptor), qui reconnaît un peptide chargé sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), dit *MHC de classe II* quand ce MHC est présenté par une cellule présentatrice d'antigène, ou *MHC de classe I* quand il est présenté par une autre cellule. Ainsi le *MHC de classe I* présente des peptides endogènes, tandis que le *MHC de classe II* présente des peptides exogènes "ramassés" par la cellule présentatrice d'antigènes au hasard des phagocytoses (ainsi qu'une majorité de peptides endogènes de la cellule APC qui sont normalement ignorés). Contrairement à une idée répandue, il n'y a pas de relation bi-univoque entre un TCR unique et un peptide unique: au contraire, un TCR peut reconnaître plusieurs peptides "proches", et symétriquement un même peptide peut activer différents clones de TCR. Il existe un très grand nombre de TCR différents, leur génération est possible par un mécanisme de recombinaison génétique sur un mode aléatoire. Un TCR doit normalement ignorer les peptides endogènes (le *soi*) et, du moins en physiologie, les peptides d'origine *alimentaire* (sous réserve d'une bonne "éducation" des lymphocytes T dans le thymus, vers le début de la vie). Chimiquement, cela se traduit par une absence d'affinité pour ces peptides. En revanche, pour les peptides dont il est spécifique, le TCR présente une grande affinité et *une seule* de ces liaisons peut déclencher *l'activation* du lymphocyte T. Le mécanisme exact n'est pas connu avec certitude: il est probable que la *durée de liaison* du TCR à son peptide soit un facteur important, tandis que le *nombre* de liaisons, est parfois considéré moins pertinent (cependant, ce nombre de liaison semble effectivement critique pour le bon fonctionnement des CAR-T cells, voir plus loin)¹⁷.

Cette activation n'est cependant pas automatique et nécessite deux signaux de *coactivation*, nommés *signal 2* et *signal 3*¹⁸: le *signal 2* est l'activation du récepteur CD28 à la surface du lymphocyte T, par la cellule présentatrice d'antigène (par son ligand CD80). Mais l'APC ne présente CD80 que lorsqu'elle a perçu un *signal de danger*, via

¹⁷ Débat scientifique non tranché. Quel que soit le mécanisme d'activation, une plus grande quantité d'antigène augmente, toutes choses égales par ailleurs, la probabilité de rencontre entre un TCR et un peptide chargé sur le MHC, il existe donc une certaine relation dose-effet entre antigène et réponse immunitaire. Ceci constitue une hypothèse importante des deux modèles présentés plus loin.

¹⁸ Le *signal 1* est la reconnaissance du peptide par le TCR.

l'activation de ses TLR (Toll-like receptors), une famille de nombreux récepteurs membranaires dont le rôle est de détecter des *pattern* signant la présence de nombreux pathogènes (bactéries, virus). Parmi les nombreux motifs moléculaires pouvant activer les TLRs, on trouve des Heat Shock Proteins (HSP), des protéines de résistance à divers stress cellulaires, qui sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses. L'activation des TLR par les rayonnements ionisants est désormais bien documentée (47), il est plausible que le mécanisme implique la production de HSP ou le relargage des HSP intra-tumorales.

Le *signal 3* est une stimulation par diverses cytokines (peptides de signalisation), comme l'interféron de type 1 et l'interleukine 12 (IL-12). Le *signal 3* joue un rôle indispensable dans l'expansion correcte du nombre de lymphocytes T spécifique du peptide reconnu par le *signal 1*. Cette expansion numérique est indispensable car initialement, il ne circule qu'un très petit nombre de lymphocytes spécifiques du peptide (à ce stade ils sont dits *naïfs*), ce nombre initial est insuffisant pour combattre efficacement le pathogène.

Si les 3 signaux sont activés, alors le nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques du peptide augmente rapidement, le pathogène est combattu avec énergie, tandis que certains lymphocytes se différencient en lymphocytes *mémoires*, aux propriétés anti-pathogène augmentées, ainsi qu'en lymphocytes T *helpers* (auxiliaires) CD4+, une famille de lymphocytes T aux fonctions diverses, qui ne sont pas directement cytotoxiques, et sont souvent présentés de manière dichotomique avec les CD4+ à *réponse th1*, impliqués dans la production de cytokines (comme l'interféron, des interleukines comme l'IL-12 et l'IL-2) ce qui provoque l'amplification de la réponse immunitaire via la costimulation des lymphocytes T cytotoxiques et via de nombreux effecteurs de la réponse innée - macrophages et NK -, tandis que les CD4+ à *réponse th2*, amplifient une réponse dite *humorale*, impliquant les lymphocytes B (idéalement capables de production d'anticorps spécifiques du pathogène) et certaines cellules de la réponse innée (éosinophiles, basophiles, mastocytes)¹⁹.

Le rôle des lymphocytes B et de la réponse humorale est encore peu étudié en oncologie. Pour certains, les lymphocytes B pourraient jouer un rôle dans

¹⁹ La dichotomie entre réponse th1 et th2 n'est pas complètement suffisante: par exemple la réponse *th17*, liée à l'interleukine 17, est non classable en *th1* ou *th2*. Cette réponse est liée à des pathologies auto-immunes, et semble modulée par le microbiome intestinal (48).

l'échappement immunitaire du cancer, en participant à l'immuno tolérance (49). Récemment, une association entre l'activité des lymphocytes B et la réponse aux immunothérapies a également été montrée dans le mélanome (50). Si un rôle anti-tumoral des lymphocytes B commence d'être suspecté, il n'a pas encore été fermement établi.

Il existe enfin une catégorie de lymphocytes T dont la fonction est de stopper la réaction immunitaire: les lymphocytes T régulateurs (Treg). Sans eux, la stimulation positive et réciproque entre l'immunité innée et adaptative produirait une réponse immunitaire persistante et néfaste. Le dysfonctionnement des Treg est possiblement impliqué dans les mécanismes des différentes hypersensibilités et de l'auto-immunité (51).

Dans ce modèle, tout le mécanisme de l'immunité adaptative deviendrait inopérant si une cellule malade (infectée par un virus ou cancéreuse) venait à ne plus exprimer le MHC de classe I. Effectivement, c'est bien un des modes d'échappement immunitaire documenté des cancers. Les cellules NK jouent alors un rôle très important car elles peuvent tuer toute cellule qui n'exprime pas le MHC. Les mécanismes d'activation et d'inhibition des cellules NK sont complexes, elles possèdent une large famille de récepteurs (les KIRs) dont le rôle peut être inhibiteur ou activateur. Cependant, les cellules cancéreuses, de même qu'elles sont capables de pervertir ou d'inhiber d'autres effecteurs immunitaires (lymphocytes T, macrophages), peuvent inhiber les cellules NK, selon des mécanismes en cours d'élucidation.

Dysfonctionnements de l'immunité

Hypersensibilités

Les réactions d'hypersensibilité sont une réponse anormalement forte du système immunitaire à une stimulation extérieure. De la complexité du système immunitaire découlent plusieurs mécanismes possibles. Ainsi, les réactions d'hypersensibilité sont classées en 4 catégories: les trois premières (type I, II, III) sont médiées par des anticorps produits par les lymphocytes B, tandis que la quatrième (type IV) est médiée par l'immunité cellulaire (lymphocytes T, macrophages).

- Hypersensibilité de type I: fréquente, explique les phénomènes allergiques (asthme allergique, allergies alimentaires, réaction anaphylactiques), de

cinétique très rapide après exposition aux pathogènes (quelques minutes), elle est médiée par les anticorps IgE.

- ☐ Hypersensibilité de type II: rare, explique certains phénomènes auto-immuns liés à la présence d'anticorps IgM et IgG (anémie et thrombopénie auto-immune, syndrome pneumo-rénal de Goodpasture...), globalement rapide (<24h) mais non immédiate.
- ☐ Hypersensibilité de type III: moins rare que la II, implique également les anticorps IgM et IgG, sous la forme de complexes qui activent le système du complément (maladies auto-immunes "fréquentes": Lupus ou les spondylarthrites réactionnelles à une infection par certaines bactéries).
- ☐ Hypersensibilité de type IV: fréquente, n'implique pas des anticorps, repose sur une réponse inadaptée de l'immunité adaptative cellulaire (cellules T) en collaboration avec l'immunité innée (macrophages), retardée (au moins 48h), explique par exemple le rejet chronique post-greffe.

Auto-immunité

Une réaction immunitaire dirigée contre ses propres tissus, médiée par les lymphocytes T, et l'immunité adaptative cellulaire. Mais elle diffère de l'hypersensibilité de type IV car elle reflète un dysfonctionnement dans la chaîne d'activation lymphocytaire T²⁰, ou dans le dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs, tandis que l'hypersensibilité de type IV est une réaction légitime contre le *non-soi*, mais indésirable de par son intensité ou ses effets (comme le rejet d'un greffon rénal ou cardiaque). Exemples classiques d'auto-immunité: diabète de type 1, maladie coeliaque.

En oncologie, les effets secondaires des immunothérapies sont essentiellement des réactions auto-immunes, elles sont présentées dans une section dédiée.

Immunodéficiences

De multiples mécanismes possibles, congénitaux (rares) ou acquis (fréquents). Ainsi l'infection au VIH au stade SIDA aboutit à la destruction des lymphocytes T helpers (CD4+) et à l'effondrement de la réponse immunitaire contre les pathogènes opportunistes.

²⁰ Les 3 signaux de costimulation, qui ne sont pas censés être activés par un auto-antigène.

En oncologie, l'immunodéficience acquise est très fréquente par destruction directe des effecteurs immunitaires par les chimiothérapies (neutropénies, lymphopénies), la radiothérapie prolongée (lymphopénies), l'emploi des corticostéroïdes à dose élevée et prolongée, comme dans les tumeurs cérébrales primitives ou secondaires, les compressions médullaires, la lutte contre les effets indésirables des immunothérapies, la prémédication de certaines chimiothérapies à risque anaphylactique, entre autres situations classiques.

On présente ensuite les mécanismes (*pharmacodynamie*) des immunothérapies. On a évoqué précédemment la capacité d'évasion du système immunitaire par la tumeur, nous voyons ici par quels moyens pharmacologiques il est possible de s'y opposer.

Inhibiteurs de checkpoint immunitaires (ICI)

Anti - CTLA 4

Pharmacodynamie

CTLA 4 est un récepteur de membrane appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette famille de récepteurs contient des membres *activateurs* et *inhibiteurs*. Parmi les activateurs, on trouve CD28 (le récepteur de co activation lymphocytaire T), ICOS, et parmi les inhibiteurs on trouve PD1, CTLA 4, TIGIT, BTLA. Globalement, ces récepteurs sont tous susceptibles d'être exprimés, mais dans des proportions très variables selon les types cellulaires. On pense actuellement que CTLA 4 est exprimé sur les lymphocytes T cytotoxiques mais aussi, et de manière préférentielle, sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) et qu'il joue un rôle primordial dans l'immuno tolérance et l'équilibre du microbiome intestinal avec la muqueuse colique. Une particularité importante de CTLA 4 est qu'il partage les *mêmes* ligands que le récepteur activateur CD28 (à savoir les molécules CD80 et CD86), qui sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigène. L'affinité de CTLA 4 pour ces ligands communs est plus importante que celle de CD28, aussi l'on pense que l'action inhibitrice de CTLA 4 s'exerce de manière indirecte en "volant" les ligands CD80 et CD86, qui seraient normalement "destinés" à engager CD28 et à co-stimuler les lymphocytes. Ensuite, le complexe CTLA 4 + ligand est internalisé par endocytose et détruit dans les lysosomes.

Ainsi, dans ce modèle, le mécanisme d'action d'un traitement par un anti CTLA 4 reposerait en grande partie sur une augmentation de la *co-stimulation*. Lors d'un

traitement, on peut constater une expansion non spécifique d'un grand nombre de lymphocytes T et en particulier des lymphocytes T auto-réactifs. En revanche, il n'existe pas d'expansion spécifique de lymphocytes reconnaissant des antigènes d'intérêt comme des antigènes tumoraux. Il faut donc s'attendre à une efficacité assez largement "diluée" dans des effets secondaires auto-immuns, en particulier au niveau colique avec la perturbation de la tolérance vis-à-vis du microbiome. Le fait que CTLA 4 soit globalement surexprimé dans les Treg, implique que son blocage puisse conduire à une co-activation puis une expansion du nombre de Treg. Cette expansion paradoxale des Treg sous anti CTLA 4 a parfois été constatée, elle est peut-être sans importance ou co-responsable d'une diminution de l'efficacité thérapeutique. Des stratégies de déplétion des Treg combinées à un blocage CTLA 4 semblent efficaces au point de vue anti-tumoral, mais générateurs de toxicités auto-immunes, dans des modèles animaux. Cette ubiquité des récepteurs entre cellules de polarisation opposée n'est pas une exception (on la retrouve également pour l'axe PD1:PDL1), elle est probablement co-responsable d'une insuffisance d'activité pharmacologique ou d'effets paradoxaux (voir chapitre sur l'hyper progression).

Globalement, le blocage de CTLA 4 est le premier inhibiteur de checkpoint qui a été ciblé par un anticorps commercial, mais son activité plus faible et son profil de toxicité moins favorable par rapport aux inhibiteurs de l'axe PD1:PDL1 l'ont quelque peu déclassé quand ces derniers ont été commercialisés. Nous verrons dans la section suivante que les traitements en combinaison (double blocage CTLA 4 et axe PD1:PDL1) pourraient donner une deuxième vie à cette classe thérapeutique. Pour une revue des mécanismes connus du blocage CTLA 4, voir (52).

Aspects commerciaux

L'ipilimumab, premier inhibiteur de checkpoint commercial, approuvé initialement en 2011 pour le mélanome métastatique, était jusqu'à 2018-2020 en perte de vitesse, car en danger d'être définitivement supplanté par les inhibiteurs de l'axe PD1:PDL1 comme le pembrolizumab ou le nivolumab. Au Q1 2021, l'ipilimumab (anti-CTLA4) ne représentait que 25% des ventes du nivolumab (anti-PD1 du même fabricant). Cependant, en 2018 et 2020, la combinaison nivolumab et ipilimumab a reçu plusieurs autorisations FDA, en particulier dans le poumon métastatique, avec et sans chimiothérapie: étude CHECKMATE 227 (53). On constate depuis 2021, une importante

croissance des ventes de l'ipilimumab (+38% au Q2 2021, la plus forte croissance parmi les médicaments au portefeuille du fabricant). Il est encore tôt pour juger de l'avenir de cette double immunothérapie en France, l'avis favorable de la HAS de juin 2021 contient des réserves: doutes concernant la place d'une double immunothérapie par rapport aux mono-immunothérapies, et sur le profil de tolérance de la double immunothérapie²¹. Les réserves de l'HAS font suite à des préoccupations exprimées par l'EMA²². Les retours d'expérience clinique devraient progressivement clarifier cette situation.

Anti -PD1 et anti -PD L1

Pharmacodynamie

PD-1 (programmed-cell death 1) est une protéine transmembranaire exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B, cellules dendritiques, macrophages) ainsi que par les tumeurs. On lui connaît au moins deux ligands PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est exprimé par les tumeurs ainsi que par de nombreux effecteurs immunitaires. PD-1 appartient aussi à la *superfamille des immunoglobulines*, dans laquelle on trouve CD28 (voir supra, impliqué dans le signal 2 de la costimulation du lymphocyte T par la cellule présentatrice d'antigène) et CTLA 4.

Dans un lymphocyte T, lorsque PD-1 est lié par son ligand PD-L1, les signaux d'activation sont diminués, ce qui impacte négativement l'expansion lymphocytaire et la production d'interféron, tandis que le nombre de lymphocytes T régulateurs augmente. Les tumeurs peuvent exploiter cette propriété en exprimant PD-L1 à leur surface, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire.

Structurellement, PD-1 est distinct du TCR, il existe cependant un lien *fonctionnel* car PD-1 régule (à la baisse) l'activité du TCR. PD-1 est exprimé par une variété de cellules, au-delà des lymphocytes T: macrophages, lymphocytes B, lymphocytes NK.

Le scénario "idéal" du lymphocyte T exprimant PD-1 tandis que la tumeur exprime PD-L1 est donc une simplification, car de nombreuses cellules du microenvironnement tumoral les expriment aussi PD-1 ou son ligand. L'effet du blocage sur les autres cellules n'est pas encore bien compris, mais l'activité des macrophages et des lymphocytes B est probablement modulée par l'axe PD1:PD-L1 (54). Il est possible que le blocage de cet

²¹ Commission de la Transparence, avis du 16 juin 2021, disponible en ligne.

²² EMA, 28 février 2020: *Withdrawal of application to change the marketing authorisation for Opdivo (nivolumab) and Yervoy (ipilimumab)*

axe entraîne parfois des expansions de populations comme les TAM avec des effets paradoxaux d'accélération de la croissance tumorale (voir hyper progression).

En quelques années, le blocage de l'axe PD1:PD-L1 est devenu une classe thérapeutique incontournable en oncologie. Le rythme des autorisations de mise sur le marché a été exceptionnellement élevé.

Ainsi, à la mi-2021, trois anti-PD1 (*pembrolizumab*, *nivolumab*, *cemiplimab*) et trois anti PD-L1 (*atezolizumab*, *avelumab*, *durvalumab*) sont actuellement approuvés (FDA et EMA).

Principales indications des anti PD1 et anti-PDL1

Le *pembrolizumab* a été approuvé dans les cancers suivants²³:

- Mélanome: métastatique et inopérable (2013); adjuvant (2018).
- Cancer du poumon: métastatique 2ème ligne (2015), métastatique 1ère ligne en monothérapie (2016), métastatique 1ère ligne en combinaison avec chimiothérapie (2017 non épidermoïde, 2018 épidermoïde), en adjuvant des cancers traités par radiochimiothérapie (2019).
- Carcinome urothélial: métastatique 2ème ligne (2017).
- Cancers ORL: métastatique ou récidive 2ème ligne (2016) puis 1ère ligne (2019).
- Toutes tumeurs solides avec instabilité microsatellitaire (MSI-H) ou déficience dans le système mismatch repair (dMMR) (2017): 1ère autorisation d'un anti-cancéreux en "pan-tumoral".
- Cancer de l'œsophage, de l'endomètre, du col utérin, du rein et d'autres localisations depuis 2017.

Le *nivolumab* a été approuvé dans les cancers suivants:

- Mélanome: métastatique et inopérable en monothérapie (2014), en combinaison avec l'ipilimumab (2015), en adjuvant (2017).
- Cancer du poumon: métastatique 2ème ligne (2015, petites cellules 2018), en combinaison avec ipilimumab (2020).
- Cancer ORL (2016), urothélial (2017), colorectal (2017), CHC (2017), Lymphome de Hodgkin (2016) et d'autres localisations.

²³ Les indications précises sont simplifiées pour la lisibilité. Les documents officiels de prescription FDA, EMA sont en libre accès sur internet.

Le *cemiplimab* a été approuvé dans le cancer de la peau de type épidermoïde (2018), de nombreux essais sont en cours dans de nombreuses indications (cancer du poumon, prostate, col utérin, ovaire, pancréas, glioblastome...).

Pour les anti-PD-L1:

L'*atezolizumab* a été approuvé dans les cancers suivants:

- Carcinome urothélial métastatique 2ème ligne (2016).
- Cancer du poumon: métastatique 2ème ligne (2016 non épidermoïde, 2018 épidermoïde), métastatique 1ère ligne en combinaison avec chimiothérapie (2019), adjuvant après chirurgie et chimiothérapie (octobre 2021).
- cancer du sein triple négatif métastatique, en combinaison avec chimiothérapie avec expression de PD-L1 (2019).

L'*avelumab* a été approuvé dans les cancers suivants:

- carcinome à cellules de Merkel, une tumeur cutanée rare (2017).
- carcinome urothélial métastatique 2ème ligne (2017).
- cancer du rein métastatique, en combinaison avec l'axitinib (2019).

Le *durvalumab* a été approuvé dans les cancers suivants:

- carcinome urothélial métastatique 2ème ligne (2017).
- cancer du poumon adjuvant après radiochimiothérapie (2018: étude PACIFIC).
- de nombreuses autres indications et combinaisons avec radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapies actuellement en cours.

Succès commerciaux des inhibiteurs de checkpoints

Cette longue liste des autorisations de mise sur le marché obtenues en quelques années, est évidemment une excellente nouvelle pour les patients atteints de cancer. Il n'est pas exagéré de parler de révolution si l'on considère le degré d'innovation technologique et le nombre des patients concernés. Leurs coûts élevés sont cependant un obstacle à leur diffusion non seulement dans les pays à faible revenus, mais aussi dans les pays plus riches (certains auteurs emploient désormais l'euphémisme de "*toxicité financière*").

Certes, un phénomène de concurrence est actuellement en cours, dont témoigne une certaine redondance dans les autorisations, avec des molécules aux programmes de développement souvent proches. On peut certes espérer des baisses de coût saluaires pour les systèmes de santé, mais dans des proportions qui devraient rester modérées.

En effet, les inhibiteurs de checkpoint sont désormais des produits phares de plusieurs compagnies pharmaceutiques. Ainsi, le *pembrolizumab* représentait à lui seul, au premier trimestre 2021, 30% des ventes de son fabricant (14.4 milliards de USD sur un total de 48 milliards) avec un taux de croissance annuelle de 30%, tirant l'essentiel de la croissance des revenus du groupe²⁴. Les autres molécules ne sont pas aussi lucratives, car elles ont obtenu moins d'autorisations que le *pembrolizumab*, mais le *nivolumab* représentait 7 milliards de USD de revenu annuel pour son fabricant au premier trimestre 2021.

Ces sommes et leur importance pour les marchés financiers ne sont pas anodines pour la recherche. Elles impliquent une cinétique rapide des programmes de recherche visant à obtenir un maximum d'autorisation. Le design des études cliniques doit donc être rapide, avec peu de place pour l'optimisation des schémas thérapeutiques: la molécule innovante sera souvent *ajoutée* à un protocole de référence, dont les modalités (dose, fréquence) ne seront pas modifiées (car l'étude serait plus complexe et plus longue), indépendamment des considérations sur les éventuelles modifications pharmacodynamiques d'efficacité et de toxicité (antagonismes et synergies).

Les essais de grande taille sont a priori des tentatives *uniques*: en cas d'échec en phase III, l'indication est abandonnée, en cas de succès, les modalités thérapeutiques de l'essai sont définitivement validées. Ainsi, la fenêtre d'opportunité pour la recherche clinique est limitée dans le temps.

La priorité des centres souhaitant peser dans la recherche médicale doit donc être tournée vers les phases *précoces*, en adressant les difficultés organisationnelles pour répondre à une demande massive sur une période de temps courte. Au-delà des problèmes d'organisation et de ressources, avoir les capacités de proposer des essais précoces dont le rationnel scientifique est solide et innovant est un challenge, nécessitant de la pluridisciplinarité, par conséquent le fossé s'est creusé entre les pays selon la nature de leur écosystème de recherche scientifique: globalement, la part des pays ayant un système de recherche universitaire bien intégré dans l'environnement économique (USA, Europe du Nord, Asie) a fortement augmenté aux dépens des autres²⁵.

²⁴ communication de la compagnie aux investisseurs, revenus au T1 2021.

²⁵ Avec bien sûr des exceptions, tel le Marseille Immunopole, avec un très fort degré d'intégration recherche fondamentale - industrie.

L'intérêt de la modélisation en médecine peut être aussi d'aider à choisir des rationnels pour les phases précoces. Mais il existe un conflit entre la temporalité longue du travail de recherche et la nécessité d'aller au rythme des besoins industriels. Le choix de développer des modèles relativement simples, pas trop spécifiques et réutilisables va dans ce sens.

Ces difficultés seraient un *non-problème* si les taux de réponse et durée de réponse aux immunothérapies étaient entièrement satisfaisantes. Nous verrons dans la section suivante que la réalité est nuancée.

Taux de réponse, durée de réponse des inhibiteurs de checkpoint

On présente ici quelques taux de réponse et durée de réponse pour le *pembrolizumab*, molécule ayant obtenu le plus d'autorisation, actuellement la référence dans sa classe thérapeutique²⁶.

- ☐ Mélanome métastatique naïf d'immunothérapie: taux de réponse **33%**, durée de réponse entre 1.4 mois et plus de 8.4 mois. Médiane de survie sans progression: 5.5 mois.
- ☐ Mélanome métastatique en échec après immunothérapie par *ipilimumab*: taux de réponse **25%**, durée de réponse entre 1 et plus de 11 mois. Médiane de survie sans progression: 2.9 mois.
- ☐ Cancer du poumon métastatique (NPC), en *combinaison* avec une chimiothérapie à base de platines et pemetrexed: taux de réponse **48%**, durée de réponse entre 1.1 et plus de 18 mois.
- ☐ Cancer du poumon métastatique (NPC), en combinaison avec une chimiothérapie carboplatine et (nab-) paclitaxel: taux de réponse **58%**, durée de réponse entre 2.4 et plus de 12.4 mois.
- ☐ Cancer du poumon métastatique (NPC), en monothérapie: taux de réponse **27%** ou **39%** selon le statut PD-L1, et 25-26% de durée de réponse supérieure à 18 mois.
- ☐ Cancer du poumon à petites cellules, après échec de chimiothérapie: taux de réponse **19%**, dont 56% de réponse supérieure à 18 mois.

²⁶ Source: *pembrolizumab prescribing information*, Food and Drugs Administration, août 2021.

- ☐ Cancer ORL métastatique, première ligne, en *combinaison* avec chimiothérapie: taux de réponse **36%**, durée de réponse entre plus de 1.6 et plus de 30.4 mois.
- ☐ Cancer ORL métastatique, *monothérapie*: taux de réponse **19%** ou **23%** selon le statut PD-L1 (score CPS), durée de réponse entre plus de 1.5 mois et plus de 34.8 mois.
- ☐ Cancer urothélial après échec sous chimiothérapie: taux de réponse **21%**, durée de réponse entre 1.6 et plus de 15.6 mois.
- ☐ Cancer MSI-H/dMMR: taux de réponse **39.6%**, dont 78% de réponse supérieure à 6 mois.
- ☐ Cancer gastrique après échec de traitement systémique (au moins 2 lignes): taux de réponse **13.3%** dont 26% de réponses de plus de 12 mois.
- ☐ Cancer de l'œsophage après échec de traitement systémique: taux de réponse **22%** ou **20%** (selon le nombre de lignes de traitement), durée de réponse entre plus de 2 mois et plus de 25 mois.
- ☐ Cancer du col utérin en récurrence ou métastatique: taux de réponse **14.3%**, durée de réponse entre plus de 4.1 mois et plus de 18.6 mois.
- ☐ Carcinome hépatocellulaire après échec ou intolérance au sorafénib: taux de réponse **17%**, dont 56% de plus de 12 mois.
- ☐ Carcinome rénal, en combinaison avec *axitinib*: taux de réponse **59%**, durée de réponse non disponible.
- ☐ Cancer de l'endomètre métastatique après échec d'une ligne de traitement systémique, en combinaison avec *lenvatinib*: taux de réponse **38%**, durée de réponse entre plus de 1.2 et plus de 33 mois.

Synthèse

Pris globalement, on obtient:

- ☐ Moyenne des taux de réponse en monothérapie, toutes localisations (hors dMMR) : **22 %**.
- ☐ Moyenne des taux de réponse en combinaison : **48 %**.

Les monothérapies sont donc en échec d'emblée chez *8 patients sur 10*, elles ont un intérêt clinique globalement limité, hormis chez les patients dMMR.

En revanche, les stratégies de *combinaison* offrent des taux de réponse nettement plus intéressants, cependant elles échouent d'emblée chez 1 patient sur 2, ce qui reste perfectible. Hélas, peu de stratégies de combinaison sont aujourd'hui autorisées, en comparaison des monothérapies (rapport de 1 pour 2).

Concernant la durée de réponse: *très variable*, des réponses longues (supérieure à 12-18 mois) mais pour une *minorité* des répondeurs. Une partie des répondeurs est donc confrontée à une résistance après quelques mois de traitement. Mais ceci permet l'existence de longs répondeurs et explique que les immunothérapies sont effectivement une révolution thérapeutique, pour une sous-population de patients.

Il semble donc clair que les efforts de recherche devraient, en théorie, se porter en priorité sur des essais de combinaison (immunothérapies multiples, immunothérapie-chimiothérapie, immunothérapie-thérapies ciblées, immunothérapie-radiothérapie etc). Mais le très grand nombre de combinaisons possibles interdit une exploration systématique. La modélisation, via des modèles animaux et numériques, nous semble un outil indispensable pour s'orienter vers des combinaisons plus rationnelles que d'autres.

Il semble aussi que des efforts de recherche devraient également viser à identifier des moyens de *re-sensibilisation* en cas de résistance acquise, également par le biais de combinaisons plutôt que par des changements de ligne, dans un objectif d'épargne des lignes thérapeutiques. La recherche sur les résistances acquises à l'immunothérapie est encore débutante, certains auteurs en ont proposé des définitions (55), mais les stratégies restent encore à définir.

Toxicités des immunothérapies

Mécanismes

Les effets secondaires spécifiques des immunothérapies (désignés par l'acronyme irAEs: immune related adverse effects) ont des mécanismes physiopathologiques moins bien compris et moins prédictibles que ceux des thérapies cytotoxiques classiques (chimiothérapie, radiothérapie). On connaît à ce jour plusieurs catégories de mécanismes (56):

- ☐ toxicité médiée par les lymphocytes T: la plus directe et (peut-être) la plus fréquente: impliquerait des *antigènes partagés* entre la tumeur et les tissus sains

et une expansion T *clonale*. Ce type de toxicité a été documenté avec des immunothérapies de type anti-PD1, dans le mélanome et le cancer du poumon. Ce mécanisme de toxicité est *corrélé à la réponse* à l'immunothérapie. Une corrélation a aussi été montrée entre le degré de proximité antigénique entre la tumeur et les tissus, et la fréquence des complications (57).

- ☐ Une explication alternative proposée (entre autres) par A. Ribas serait une diversification *non spécifique* des lymphocytes T, y compris des lymphocytes auto-réactifs, par certaines immunothérapies (les anti-CTLA4), cette diversification du répertoire T serait corrélée aux toxicités, mais à la différence de la précédente, elle n'est pas prédictive de réponse (58).
- ☐ L'induction d'un déséquilibre entre lymphocytes régulateurs (Treg) et lymphocytes T pourrait jouer un rôle. Mais ce phénomène pourrait être une conséquence d'un des deux précédents, et les preuves cliniques manquent, pour le moment.
- ☐ Toxicité médiée par les lymphocytes B et les auto-anticorps, qui serait de mécanisme similaire aux maladies auto-immunes à auto-anticorps. La présence d'auto-anticorps thyroïdiens avant traitement est associée à un plus grand risque de thyroïdite auto-immune sous immunothérapie. Pour les autres anticorps, en revanche, le lien entre la présence d'auto-anticorps avant ou pendant le traitement, et le développement des toxicités auto-immunes est moins clair.
- ☐ Inflammation et cytokines: une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-17, entre autres) a été corrélée avec l'occurrence des toxicités auto-immunes. Il n'est pas encore établi que ce phénomène soit indépendant des précédents: l'étude de *signatures cytokiniques* avant et pendant traitement représente une piste d'investigation intéressante.
- ☐ Rôle du microbiote intestinal: la muqueuse intestinale est désormais envisagée comme un site essentiel pour l'apprentissage de la tolérance immunitaire et l'induction des Treg: elle serait en taille le premier organe lymphoïde et le lieu d'une rencontre permanente entre le système immunitaire et les antigènes alimentaires et bactériens de la flore intestinale (59). Plusieurs études ont relié la présence de certaines bactéries intestinales avec la sévérité des toxicités auto-immunes, ainsi que dans la réponse aux immunothérapies (60,61). Des

transplantations fécales sembleraient même avoir guéri des patients atteints de colite auto-immune sévère réfractaire aux immunosuppresseurs (62), mais ces résultats demandent à être reproduits.

La compréhension de ces mécanismes permettra peut-être de repousser les limites de certaines combinaisons dans lesquelles les toxicités pourraient se révéler limitantes (voir plus loin, pour l'immuno-radiothérapie).

Une meilleure compréhension permettra peut-être aussi de mieux sélectionner les patients pour les immunothérapies. En particulier, les patients présentant des pathologies auto-immunes pré-existantes sont systématiquement écartés des essais cliniques. Pour plusieurs auteurs, si le risque est certes plus élevé avec ces patients, leur exclusion systématique n'est pas justifiée et leur est potentiellement dommageable: la décision devrait être prise de manière individualisée, en fonction du risque (vital ou pas) posé par une éventuelle exacerbation de leur maladie auto-immune (63).

Fréquence des principales toxicités graves des immunothérapies

Une méta-analyse à la méthodologie sophistiquée (64) a classé les immunothérapies en fonction de leur profil de tolérance: si les anti PD1 ou PD-L1 sont mieux tolérés que les anti - CTLA4, il existe également un effet dose, et les combinaisons anti-PD1 + anti-CTLA4 sont plus toxiques. Les auteurs ont proposé une classification entre diverses molécules commerciales à l'intérieur d'une classe thérapeutique. On prendra surtout l'exemple du *pembrolizumab*, anti-PD1 de référence (de par le grand nombre de ses indications), en se basant sauf mention contraire sur les données publiques de la FDA (*FDA prescribing information*).

Les fréquences des effets secondaires diffèrent selon que les données proviennent des essais cliniques (patients sélectionnés, très peu de comorbidités) ou des études de "vraie vie" (patients tout-venant, avec comorbidités), où ils sont plus fréquents.

- ☐ toxicités dermatologiques (éruption, démangeaisons): très fréquentes, de l'ordre de 25% pour le pembrolizumab et l'ipilimumab dans les essais, mais jusqu'à 40% pour les anti-PD1 et 50% pour les anti-CTLA4 en méta-analyse. Typiquement traitées localement pendant que les ICI sont poursuivis. Généralement non graves mais d'exceptionnels cas de DRESS ont été décrits.
- ☐ toxicités gastro-intestinales (colites auto-immunes): diarrhée, douleurs abdominales, saignements pouvant aller jusqu'à des complications graves

(perforation, mégacôlon toxique). Fréquence des diarrhées: 12-31% pour le pembrolizumab dans les essais, selon les indications, avec une plus grande fréquence en combinaison avec la chimiothérapie (29-31%) qu'en monothérapie (autour de 20%).

- ☐ Hépatites auto-immunes: pour le pembrolizumab, les élévations des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT) sont très fréquentes (supérieures à 25% dans les essais) mais les perturbations graves (grade 3 ou 4) ne représentent que quelques pourcents. Ces toxicités ne semblent pas plus fréquentes en combinaison avec chimiothérapie qu'en monothérapie, elles ne surviennent pas nécessairement plus fréquemment que dans les bras contrôle avec chimiothérapie.
- ☐ Toxicités endocriniennes: diabète de type 1 (ou autre diabète auto-immun), dysthyroïdie, insuffisance surrénalienne, insuffisance hypophysaire (quasiment spécifique aux anti-CTLA4). L'hypothyroïdie (éventuellement précédée d'une courte hyperthyroïdie) est fréquente pour les anti-PD1 ou PD-L1, elle concerne environ 10-18% des patients recevant le pembrolizumab selon les essais (le plus souvent < 15%). L'utilisation d'immunosuppresseurs semble inefficace pour restaurer la fonction thyroïdienne: les patients nécessitent une supplémentation à vie.
- ☐ Toxicités rhumatologiques (arthralgies, myalgies): environ 10% des patients sous pembrolizumab dans les essais, parfois plus dans certaines séries.
- ☐ Pneumopathie auto-immune: environ 2.7% des patients sous anti-PD1, environ 1% de formes graves (65). Mais les patients avec pneumopathie pré-existante (BPCO, fibrose pulmonaire) sont plus à risque et les risques de forme grave sont augmentés en cas d'irradiation thoraciques combinée (voir plus loin). Les formes légères répondent aux corticostéroïdes, les formes sévères nécessitent des immunosuppresseurs plus puissants (anti-TNF α). Certaines formes graves sont fatales.

Toxicités et combinaisons

Les faibles taux de réponse des inhibiteurs de checkpoint en monothérapie renforcent l'intérêt pour la recherche de stratégies de combinaison à visée *synergique*. Mais les toxicités seront susceptibles d'être augmentées, en nombre et en gravité.

Le cas de la combinaison avec la radiothérapie sera discuté plus loin, mais les combinaisons synergiques entre deux immunothérapies (ou plus) sont déjà au cœur d'essais cliniques présents et à venir (voir infra quelques nouveaux inhibiteurs de checkpoint en développement).

Aussi les toxicités, en particulier celles qui sont potentiellement fatales, comme les pneumopathies et les colites auto-immunes, devraient faire l'objet d'efforts de recherche afin de mieux sélectionner les patients ou de les diagnostiquer au plus tôt (biomarqueurs?), de diminuer leur occurrence (concessions posologiques? schémas séquentiels? modulation préventive ou curative du microbiome intestinal?) ou d'améliorer leur gestion lorsqu'ils surviennent (stratégie de dépistage précoce par biomarqueurs ou imagerie? stratégie d'immunosuppression?).

Des stratégies devront être mises en œuvre pour que les toxicités en combinaison ne deviennent pas limitantes (entre autres, escalades de dose). Les formes orales d'inhibiteurs de checkpoint, actuellement à l'étude, pourraient rendre la gestion des toxicités plus simples grâce à des demi-vies plus courtes permettant des concessions posologiques rapides et une gestion plus dynamique de l'exposition des patients.

Hyperprogression sous immunothérapie

Pour une proportion minoritaire de patients, mais non-négligeable (entre 10% et 30% selon les auteurs), le cours de la maladie est drastiquement *accéléré* peu après la mise sous immunothérapie. La rupture de la cinétique de croissance tumorale avant et après traitement est alors évidente et ne peut être raisonnablement attribuée à l'histoire naturelle de la maladie. Les conséquences sont généralement dramatiques: contrôle de la maladie souvent impossible et décès plus rapide.

Des définitions radiologiques quantitatives existent, impliquant le taux de croissance tumorale avant et après traitement, avec ou sans prise en compte des nouvelles lésions.

Dans une étude rétrospective monocentrique, Matos et al (66) ont trouvé une tendance à l'augmentation du risque avec l'utilisation des anti-PD1 par rapport aux anti-PD-L1, ainsi qu'une augmentation significative en cas d'utilisation de combinaison d'immunothérapie vs monothérapie.

Si les mécanismes de l'hyper progression sont encore non élucidés, on suspecte fortement l'expression de PD1 à la surface des cellules immuno modulatrices du microenvironnement tumoral, comme les TAM et les Treg: le blocage de PD1 (ou de son

ligand PD-L1) pourrait augmenter leur activité anti-tumorale (sécrétion de cytokines immunomodulatrices) ainsi que leur prolifération, et donc précipiter l'effondrement de ce qu'il subsiste du contrôle immunitaire anti-tumoral. Cette hypothèse impliquerait un certain déficit dans l'infiltration par les lymphocytes T cytotoxiques, qui expliquerait la futilité de la tentative de les réactiver par blocage de leur récepteur PD1.

On peut envisager l'hypothèse que des stratégies de combinaison avec la radiothérapie, en déplétant le micro environnement tumoral de ses effecteurs, puis en stimulant le recrutement lymphocytaire T par libération d'antigènes tumoraux, permettrait d'éviter ce scénario. De même, les chimiothérapies cytotoxiques en concomitance pourraient aider à cette réinitialisation du microenvironnement tumoral, sans avoir à attendre les résultats de thérapies innovantes en cours de développement comme les anti CSF-1R (voir infra), censées cibler les TAM. La moins grande cytotoxicité et l'immunosuppression induite par les chimiothérapies ne permettrait cependant pas une stimulation antigénique aussi puissante que la radiothérapie.

Les résultats de certaines études récentes d'immunothérapies et de chimiothérapie en concomitance semblent aller dans le sens d'une réduction des hyper progressions. Ainsi la KEYNOTE-042 (pembrolizumab vs chimiothérapie dans le cancer du poumon métastatique, TPS>1%) présente une courbe de survie qui porte les stigmates d'hyper-progression de début de traitement (la survie est moins bonne dans le bras pembrolizumab pendant 6 mois puis il existe un croisement des courbes au-delà). On note un pattern identique dans la CHECKMATE 227 (nivolumab + ipilimumab vs chimiothérapie).

En revanche, ceci n'est pas le cas dans les courbes de survie de la KEYNOTE-189 et de la KEYNOTE-407 (pembrolizumab + chimiothérapie vs chimiothérapie, sans considération de TPS), où les courbes de survie se détachent dès le début en faveur du pembrolizumab.

Des facteurs explicatifs d'origine génétique ont été identifiés rétrospectivement, concernant des mutations tumorales (amplification MDM2/4, EGFR entre autres) et des mutations du patient (dans les gènes PD1, PD-L1, IDO1, VEGFR2). Pour le moment, leur caractère causal n'est pas établi, des facteurs confondants sont possibles. L'étude en immunohistochimie des populations lymphocytaires a également montré que certains profils de cellules semblent associés à la survenue de l'hyper progression, comme par exemple l'augmentation de la proportion de lymphocytes T CD8+ avec un profil

exhausted, au cours des premiers cycles de l'immunothérapie: ceci reflète, *ex-post*, le caractère immunologique du phénomène mais ne permet pas de sélectionner les patients *avant* de leur administrer une immunothérapie (dont la durée de persistance est de plusieurs semaines).

Un certain nombre de corrélats biologiques ont été identifiés, sans que le caractère causal ne soit établi (CRP, ratio neutrophiles sur lymphocytes, taux de LDH, nombre de métastases hépatiques...).

Pour le moment, ces facteurs associés ne sont ni parfaitement sensibles ni spécifiques, certains ne sont mesurables qu'après exposition aux immunothérapies, ils ne sont pas validés prospectivement et ils ne permettent donc pas de gestion efficace du risque d'hyper progression. Globalement, le risque d'hyper progression est important, en particulier en l'absence de chimiothérapie concomitante, et possiblement en cas de combinaison de plusieurs immunothérapies. Des efforts de recherche sont nécessaires pour mieux identifier les mécanismes et en déduire des biomarqueurs fiables (67).

Nouveaux développements

La prochaine génération d'inhibiteurs de checkpoint PD1:L1 pourrait être constituée de petites molécules, au lieu des actuels anticorps monoclonaux (ceci n'est pas sans précédent: le *bevacizumab*, premier anticorps monoclonal à visée anti-angiogénique, a été supplanté par des inhibiteurs de tyrosine kinases). De telles molécules seraient censées avoir une meilleure diffusion intra-tumorale, de plus faibles coûts de fabrication, éventuellement moins d'effets secondaires grâce à des demi-vies plus courtes. Elles sont actuellement développées par plusieurs laboratoires (dont la multinationale BMS ainsi que de nombreuses entreprises de biotechnologie) (68).

Ciblage des lymphocytes NK

Les cellules NK sont impliquées dans la lutte contre les cellules tumorales; elles sont particulièrement intéressantes par leur capacité à éliminer les cellules qui n'expriment pas le MHC classe I et peuvent ainsi échapper à la surveillance lymphocytaire T. Hélas, les tumeurs développent également des stratégies d'échappement aux cellules NK.

L'inhibition des cellules NK lors de la reconnaissance du MHC classe I repose principalement sur l'engagement de leur récepteurs membranaires KIR et sur l'hétéro-dimère CD94/NKG2A. Les récepteurs de type KIR (Killer cell

Immunoglobulin-like Receptor), font partie d'une grande famille très diversifiée (17 gènes chez l'humain, très polymorphiques) dont certains sont *inhibiteurs* et d'autres *activateurs*. Les cellules avec expression normale du MHC classe I se lient au KIR-inhibiteurs des cellules NK, tandis qu'une cellule cancéreuse sous-exprimant le MHC de classe I ne peut pas lier assez de KIR-inhibiteurs, ce qui peut conduire à l'activation de la cellule NK.

De nombreux récepteurs inhibiteurs autres que CD94/NKG2A et les KIR ont été identifiés pour les cellules NK: pour ne citer que quelques-uns, ciblables par des thérapies existantes ou en développement, il s'agit du bien connu PD-1, mais aussi de LIR1, TIGIT, LAG3, TIM3, entre autres.

Les cellules NK sont de phénotype hétérogène, comme les autres effecteurs immunitaires. Certaines sont cytotoxiques, d'autres immunomodulatrices, et identifiables par leurs récepteurs membranaires, un certain degré de plasticité (ou de porosité) entre ces catégories existe. Le recrutement intra-tumoral de cellules NK est associé à un meilleur pronostic, comme celui associé à la présence intra-tumorale de lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Dans certains cancers (gastrique, oesophagien), a été mis en évidence une diminution de l'infiltration tumorale par les cellules NK au cours de la progression de la maladie (le phénomène d'échappement immunitaire), ainsi qu'une diminution de leur capacité à produire de l'interféron γ (prostate) et une diminution de leur cytotoxicité.

Il semble que les mécanismes d'inhibitions des cellules NK au sein du microenvironnement tumoral puissent être variables et reposer sur des combinaisons impliquant plusieurs des récepteurs mentionnés. Des recherches seront nécessaires pour identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse et des combinaisons d'immunothérapies seront peut-être nécessaires pour bloquer suffisamment de voies de signalisation. La gestion des toxicités pourrait aussi s'avérer dans ce cas particulièrement délicate.

Les cellules NK semblent être particulièrement sensibles (négativement) aux conditions *hypoxiques*, qui règnent au sein des tumeurs de grande taille, partiellement nécrotique: on peut faire l'hypothèse qu'un traitement d'induction par radiothérapie pourrait aider à ré-oxygéner une telle tumeur et faciliter l'action d'une immunothérapie ciblant les cellules NK. A la différence de traitements anti-angiogéniques, la radiothérapie permettrait également un important *debulking* tumoral et un certain

degré de ré-initialisation du microenvironnement tumoral en tuant ou stérilisant les effecteurs immunitaires déjà présents et au phénotype globalement immunomodulateur. La production d'antigènes tumoraux permettrait également une potentialisation de la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T (voir section immuno-radiothérapie).

La voie du TGF β , impliquée dans la résistance à la radiothérapie, semble également responsable de l'inactivation des cellules NK, dans le cadre de son action immunomodulatrice plus globale. Des thérapies ciblant le TGF β pourraient donc avoir une pertinence pour l'immunothérapie des cellules NK comme pour l'immuno-radiothérapie.

Quelques molécules d'immunothérapie en développement et ciblant spécifiquement les NK sont actuellement le *monalizumab* (anti NKG2A), le *lirilumab* (anti KIR) et des anti TIGIT. De nombreux autres récepteurs sont à l'étude et des tests compagnons pour cibler individuellement les molécules pertinentes seraient souhaitables.

Des stratégies de combinaison visant à augmenter l'infiltration par les cellules NK et à rétablir leur phénotype cytotoxique sont à définir. On peut espérer que la radiothérapie aura un rôle important dans ce sens. Pour des revues détaillées sur les immunothérapies des cellules NK, voir (69,70).

Ciblage des TAM et autres cellules myéloïdes

Les cellules myéloïdes associées à la tumeur sont une population hétérogène constituée de macrophages de type M2 (TAM), de neutrophiles et monocytes à des stades variés de différenciation (MDSCs), qui jouent un rôle immunomodulateur au sein du microenvironnement tumoral et favorisent l'échappement immunitaire. Le ciblage des TAM et MDSCs constitue donc également une voie de recherche pour les immunothérapies. Deux classes thérapeutiques sont en cours de développement: les anti-CSF-1R visent le blocage du CSF (Colony Stimulating Factor). Les anti CSF-1R n'ont pour le moment pas montré d'activité anti-tumorale significative et sont testés en combinaison avec des immunothérapies ou des chimiothérapies, où leur profil de sécurité (en particulier leur hématotoxicité) sera à surveiller (71).

CAR-T cells

Les CAR-T cells sont des lymphocytes T autologues dont le récepteur TCR a été modifié par génie génétique pour reconnaître un antigène tumoral. Elles connaissent un succès important dans les hémopathies malignes mais il existe aussi des projets pour les utiliser dans les tumeurs solides, qui sont plus hétérogènes et moins facilement ciblables par ce type de technique qui suppose un haut degré de clonalité tumorale.

Concernant les toxicités, les CAR-T cells causent des orages cytokiniques et des neurotoxicités, potentiellement fatales.

Les mécanismes de résistance connus impliquent la perte de l'antigène tumoral par les cellules cibles et l'épuisement des lymphocytes T chimériques (qui semble en partie réversible par les inhibiteurs de checkpoint type anti-PD1).

Leur processus de fabrication et d'administration est complexe car spécifique à chaque patient. Les CAR-T cells fonctionnent en présence d'un antigène tumoral suffisamment sur-exprimé et assez spécifique pour ne pas créer des toxicités auto-immunes trop graves. Les lymphocytes du patient sont prélevés puis sont pré-activés ex-vivo par une costimulation (CD28) et des cytokines (IL-2, autres), leur récepteur TCR est modifié par l'intermédiaire d'un virus, d'un rétrovirus ou par la technologie CRISP-cas9, puis les lymphocytes T à récepteur chimériques sont réinjectés au patient, dans lequel ils rencontrent l'antigène tumoral dont ils sont spécifiques avec leur TCR chimérique (activation du signal 1) et vont théoriquement se multiplier (la co-activation par les signaux 2 et 3 ayant été pré-effectuée).

Ces techniques connaissent de réels succès dans certaines hémopathies malignes mais sont réservées aux formes réfractaires aux traitements conventionnels, en raison de leur toxicité, de leur coût et de leur faible disponibilité.

Dans les tumeurs solides, les résultats ont été décevants pour le moment. Parmi les causes possibles: la trop grande hétérogénéité antigénique des tumeurs solides induit un manque d'antigènes ciblables, la mauvaise pénétration des lymphocytes T chimériques à travers les barrières d'organes et tumorales, une faible survie des lymphocytes T chimériques à l'atteinte éventuelle du site tumorale, et le caractère immunosuppresseur du microenvironnement tumoral (72). Il existe quelques projets dans des tumeurs supposément assez homogènes. Ainsi dans le cancer de prostate métastatique résistant à la castration, une étude précoce (NCT03089203) a évalué des CAR-T cells ciblant le PSMA (prostate specific-membrane-antigen), une protéine qui

malgré un nom évocateur n'est pas complètement spécifique du cancer de prostate²⁷ (résultats en attente). Des études de CAR-T cells ont essayé, sans succès, de cibler le Glioblastome en visant les récepteurs de l'EGF. D'autres essais sont en cours, tentant de cibler d'autres antigènes tumoraux dans diverses tumeurs du système nerveux central.

Pris globalement, les CAR-T cells n'ont pas encore démontré d'utilité pour les tumeurs solides, mais des développements sont toujours en cours (73).

²⁷ le PSMA (prostate specific membrane antigen) est une protéine impliquée dans le métabolisme des folates et du glutamate, entre autres. Initialement supposée spécifique de l'adénocarcinome de prostate, on sait désormais qu'elle est exprimée dans un grand nombre de tissus sains: cerveau, système nerveux, reins, etc. Environ 8% des cancers de la prostate n'expriment pas du tout le PSMA. Le PSMA est une cible d'imagerie par TEP et une cible thérapeutique lorsqu'on lui adjoint du *lutétium 177*. On ne confondra pas le PSMA avec le PSA (prostate specific antigen), codé par un gène différent, utilisé comme biomarqueur du cancer de prostate.

Immuno-radiothérapie: généralités

Terminologie

Le terme désormais consacré d'*immuno-radiothérapie* est employé pour décrire l'utilisation de radiothérapie produite par une source *externe* au patient, en association concomitante (ou suffisamment rapprochée) avec une immunothérapie, dont les inhibiteurs de checkpoints sont le cas particulier le plus répandu.

Le terme voisin de *radioimmunothérapie*, désigne une technique de radiothérapie *interne*, administrée par voie orale ou intraveineuse, qui exploite les propriétés biologiques d'un anticorps couplé à un isotope radioactif.

Mécanismes d'efficacité de l'immuno-radiothérapie

On a présenté plus haut les mécanismes supposés d'action de la radiothérapie puis de l'immunothérapie; ce chapitre expose les mécanismes situés à l'intersection des deux.

La radiothérapie peut stimuler le système immunitaire. On sait depuis longtemps que les rayonnements ionisants produisent des aberrations chromosomiques qui aboutissent à la formation de micronoyaux dans le cytosol contenant des chromosomes avec de nombreuses anomalies. L'ADN contenu dans les micronoyaux peut ensuite "fuir" dans le cytosol, dans les quelques jours suivant l'irradiation (74). Ce phénomène est connu depuis un siècle et fut initialement utilisé comme un marqueur de mort cellulaire.

On sait désormais que la présence (anormale) d'ADN dans le cytosol (au lieu qu'il soit confiné dans le noyau) active la voie pro-inflammatoire sGAS-STING, qui stimule la production d'interféron de type 1, qui joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire, via la présentation des antigènes tumoraux aux cellules dendritiques (75,76) qui activeront à leur tour les lymphocytes T pour produire et amplifier une réponse immunitaire adaptative dirigée contre des antigènes tumoraux.

Cette production d'IFN type 1 semble dose-dépendante et nécessite du fractionnement avec des doses par fraction relativement élevées: 5 Gy x 2 dans (77) ou 8 Gy x 3 dans (78), mais inférieures à certaines limites, car des doses supérieures (de 10 à 20 Gy en dose unique selon les expériences) ne semblent pas induire de production d'interféron.

Depuis récemment, on soupçonne qu'au-delà de certaines concentrations d'ADN cytosolique, l'activation d'une exonucléase (Trex1) provoque la dégradation de cet ADN,

ce qui inhibe la voie cGAS-STING, la production d'interféron et *in fine* la stimulation de la réponse immunitaire (79). Ceci expliquerait la perte de l'effet immunitaire pour de fortes doses délivrées sur un temps court, comme décrit avec une monodose de 20 Gy dans (80).

A de très fortes doses (supérieures à 10 Gy par fraction), la radiothérapie induirait une surexpression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), ce qui augmenterait la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Ce mécanisme semble dose-dépendant jusqu'à des doses bien supérieures à celles où la voie de l'ADN cytosolique est inhibée, puisqu'il a été vérifié expérimentalement jusqu'à 30 Gy en une fraction, le pic d'expression du CMH I intervenant alors avec un délai de 2 à 3 jours par rapport à l'irradiation et semblant lié à la libération de peptides intra-cellulaires par l'irradiation. Il est également noté une plus grande richesse du répertoire des peptides présentés par les molécules du CMH I (81).

Ces résultats expérimentaux sont souvent obtenus pour des monodoses, pour des raisons de praticité, et parfois pour quelques doses: leur extrapolation à une radiothérapie délivrée sur plusieurs fractions, sur plusieurs jours ou plusieurs semaines, ne peut être obtenue que par modélisation.

Pour les doses par fraction les plus utilisées en pratique clinique courante (1.8 - 2 Gy), les effets précédents ne sont pas décrits, mais on observerait des modifications dans le microenvironnement tumoral, avec une tendance à la normalisation de la vascularisation tumorale, qui deviendrait moins anarchique et permettrait une meilleure infiltration par des lymphocytes T, ainsi qu'une tendance à la diminution de la proportion de macrophages de type M2 (qui sont immuno modulateurs et diminuent la réponse immunitaire) en faveur des macrophages de type M1 (participant activement à la réponse immunitaire) (82). Mais il n'est pas certain que ces bénéfices de court terme soit maintenus dans le temps chez l'Homme: la radiothérapie à dose 1.8-2 Gy est prolongée sur plusieurs semaines, entraîne à terme une toxicité microvasculaire responsable d'hypoxie puis de sénescence cellulaire précoce, comme par exemple dans l'irradiation pan-cérébrale (83). La théorie de la normalisation vasculaire des basses doses de radiothérapie reste encore à prouver en clinique. De plus, à 2 Gy par fraction, les lymphocytes intra-tumoraux sont pratiquement tous détruits, quotidiennement, pendant plusieurs semaines, créant une authentique immunosuppression locale pendant au moins toute la durée du traitement, qui se combine à la fréquente

lymphopénie radio-induite caractéristique des irradiations prolongées (discutée plus loin). Même si l'on pourrait imaginer mettre à profit cette immunosuppression temporaire pour "reprogrammer" le micro-environnement tumoral par des moyens pharmacologiques, ce domaine de dose par fraction n'est pas le plus simple à exploiter pour l'immuno-radiothérapie. Cependant, il ne peut pas être modifié facilement en pratique clinique: à la hausse, à cause des problèmes de tolérance, et à la baisse, pour des problèmes de contrôle local. On verra donc que de nombreux essais cliniques d'immuno-radiothérapie utilisent, probablement faute de mieux, le normo fractionnement à 1.8 - 2 Gy par fraction.

A très basse dose par fraction (entre 0.1 et 1 Gy), on sait depuis les années 1980 que certaines tumeurs possèdent une hypersensibilité aux rayonnements ionisants, qui n'est pas décrite correctement par le modèle LQ, en particulier certaines histologies radio-résistantes aux doses usuelles (2 Gy/fraction) (84). Plus récemment, des effets immunologiques intéressants ont été observés dans des modèles précliniques (82,85). Entre autres explications, un nombre significatif de lymphocytes intra-tumoraux sont épargnés, et il existe un effet pro-inflammatoire significatif et un bon recrutement lymphocytaire intra-tumoral, maximum entre 0.5 et 1 Gy dans des modèles animaux. Mais ces niveaux de dose sont insuffisants pour espérer le contrôle local sur la base de la seule radiobiologie classique, leur utilisation est donc un pari sur une grande efficacité de l'immunothérapie, ou nécessiterait un nombre de fractions nettement plus élevé que les traitements habituels, cette voie prometteuse reste donc encore peu explorée à l'heure actuelle. Des résultats cliniques commencent à être disponibles (86), ils sont générateurs d'hypothèses, mais obtenus dans des conditions expérimentales discutables²⁸ avec de petits effectifs.

On remarque que ces "basses doses" sont courantes dans les tissus de voisinage, non tumoraux. Ainsi, en radiothérapie externe, les organes à risque pourraient être particulièrement exposés à des phénomènes pro-immunitaires radio-induits, ce qui pourrait contribuer à la toxicité de l'immuno-radiothérapie, qui sera discutée plus loin. Corollaire: les seuils de dose pour la toxicité immuno-induite seraient alors plus faibles que ceux liés à la toxicité radiobiologique classique.

²⁸ Hétérogénéité des bras pour les types de tumeur, les fractionnements, les traitements systémiques, pas de définition précise des patients progressifs (risque d'inclusion de pseudo-progressifs), entre autres.

Il existe donc, à tous les niveaux de dose, plusieurs mécanismes biologiques qui rendent plausible l'hypothèse que la radiothérapie peut stimuler l'immunité innée et adaptative, et qu'une partie de son efficacité soit médiée par le système immunitaire. La combinaison avec une immunothérapie serait alors pertinente et pourrait produire une synergie, où l'efficacité de la combinaison serait supérieure à la somme de l'efficacité de ses composantes.

La mise en œuvre de ces innovations se heurte au classicisme des conceptions radiobiologiques actuelles, où l'effet de la radiothérapie est encore interprétée uniquement sous l'angle d'une relation dose-effet entre l'énergie du rayonnement et le contrôle tumoral local (modèle linéaire quadratique et ses éventuelles variations).

De plus, chez l'Homme, seul l'effet de la radiothérapie sur le contrôle local a été extensivement étudié. La récurrence à distance est supposée être le domaine des chimiothérapies et des traitements systémiques: la radiothérapie n'est pas supposée y contribuer (sauf, de façon indirecte, par l'amélioration du contrôle local).

Or le taux de récurrence locale mesure un effet global: somme d'une cytotoxicité liée aux concepts radiobiologiques classiques et d'un hypothétique effet immunitaire. Établir la part relative de chaque composante est difficile hors de conditions expérimentales.

Effet abscopal

La mesure d'une éventuelle réponse à *distance* (hors champ d'irradiation), permettrait de prouver et de quantifier la contribution immunitaire de la radiothérapie ou de l'immuno-radiothérapie (si l'on suppose qu'une telle action à distance soit exclusivement, ou majoritairement, le résultat de l'action du système immunitaire²⁹). On nomme *effet abscopal* cette réponse tumorale dans les tissus non irradiés, ou ceux irradiés à une faible dose non curative³⁰. Son origine immunitaire est désormais hautement suspectée (via les mécanismes présentés plus haut): ainsi, dans des modèles

²⁹ La voie de signalisation des *céramides* serait peut-être une voie non immunologique de l'effet abscopal; étant donné l'extrême rareté de l'effet abscopal en l'absence d'immunothérapie, on ne considèrera pas ce mécanisme non-immunologique, comme cliniquement significatif.

³⁰ Cette irradiation à basse dose concerne les tissus de voisinage situés dans le trajet du faisceau d'irradiation. Avec les techniques modernes de radiothérapie externe qui multiplient le nombre de faisceaux, comme avec l'arc-thérapie où le faisceau d'irradiation tourne autour de la cible, ces volumes irradiés à basse dose peuvent être larges. Parfois, une métastase peut être comprise dans une zone de pénombre, mais la dose reçue est alors non-curative. La Curiethérapie n'est pratiquement pas concernée (voir section correspondante).

animaux, l'effet abscopal peut être aboli par une déplétion en lymphocytes CD8+, tandis qu'il peut-être potentialisé en stimulant la réponse immunitaire (87).

L'effet abscopal est cependant un phénomène très rare lorsque la radiothérapie est utilisée en monothérapie. D'après (88), il a été rapporté dans seulement 47 cas cliniques de 1960 à 2018 (soit moins d'un cas par an). Même à supposer que seule une fraction des cas fait l'objet d'une publication, il demeurerait tout à fait exceptionnel. Son observation est d'autant plus difficile que lorsqu'un traitement systémique est utilisé avec ou après la radiothérapie, cet éventuel effet abscopal tend à être attribué à l'effet de ce traitement.

Cependant, depuis une dizaine d'années, avec la plus grande disponibilité des immunothérapies (notamment grâce aux inhibiteurs de checkpoints), des chercheurs ont exploré le champ de l'immuno-radiothérapie et cherché à produire plus fréquemment cet effet *abscopal*. Initialement, dans des expériences de laboratoire (sur des versions animales de ces anticorps monoclonaux), puis dans des essais cliniques chez l'Homme (89,90). La fréquence d'observation de l'effet abscopal a ainsi augmenté considérablement: 18% dans (90), 27% dans (89), contre pratiquement zéro auparavant.

Cependant, en l'absence de groupe contrôle dans ces deux essais, il n'est pas possible d'attribuer forcément les réponses abscopales à l'effet de la radiothérapie, puisqu'il pourrait s'agir dans certains cas d'une réponse (retardée) à l'immunothérapie.

Ainsi, dans (90), l'argumentation pour l'obtention d'un effet abscopal repose sur des arguments biologiques indirects (expansion du répertoire du CMH en post-radiothérapie, par exemple); de plus les patients étaient naïfs d'immunothérapie et auraient donc pu répondre à l'immunothérapie sans radiothérapie; Dans (89), la thérapie systémique utilisée est un facteur de croissance des cellules myéloïdes (du GM-CSF), qui n'est pas connu pour avoir en soi une action anti-tumorale: la causalité de la radiothérapie dans le taux de 27% d'effet abscopal semble donc plausible, mais non certaine.

Enfin le taux moyen d'effet abscopal dans ces deux études ne s'élève qu'à environ 22%, et cette fréquence se compare à celle des taux de réponse aux immunothérapies, qui est de 21% pour les anti-PD1 ou -PDL1 dans une méta-analyse de 2018 (91).

L'étude récente Pembro-RT a randomisé des patients atteints de cancer du poumon NPC métastatique entre pembrolizumab et pembrolizumab plus SBRT sur une seule

lésion. Elle a montré une tendance à une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale dans le bras combiné, mais ces résultats étaient non significatifs (92). L'effet abscopal n'a pas été quantifié par les investigateurs, mais ces résultats sont encourageants d'autant qu'une analyse en sous-groupe a montré un effet plus fort pour les tumeurs *négatives* pour PDL1, donc pour les tumeurs *a priori* moins sensibles aux anti-PD1.

Une autre étude récente du MDACC (93), a randomisé des patients atteints de cancer du poumon NPC métastatiques entre Pembrolizumab et Pembrolizumab plus radiothérapie sur 1 à 4 lésions (selon une technique classique ou en SBRT en fonction de la faisabilité). Il n'a pas été mis en évidence de bénéfice significatif en survie sans progression sur l'ensemble des patients, cependant un léger bénéfice apparaît pour le groupe des tumeurs *faiblement* positives pour PDL1 (mais pas dans les PDL1 *négatifs*, à la différence de Pembro-RT). Le taux d'effet abscopal était plus important en cas d'utilisation de la SBRT (38%) que de la radiothérapie classique (10%) ($p=0.11$), ce qui entre dans la modélisation du deuxième article de cette thèse.

Pour le moment, ces résultats sont globalement encourageants mais pas assez significatifs pour justifier des coûts et des toxicités supplémentaires induits par une utilisation plus systématique de la radiothérapie.

La variété des mécanismes biologiques impliqués a esquissé le tableau d'une machine moléculaire complexe. Il n'est donc pas surprenant que l'efficacité de l'immuno-radiothérapie soit très variable: tout autant, sinon plus, que peut l'être celle de l'immunothérapie.

Des biomarqueurs et des modèles seraient nécessaires pour une meilleure sélection des patients, et une meilleure optimisation des cibles et des doses, mais ils font actuellement défaut.

Mécanismes de résistance

On a vu que l'immunité contribue à l'action de la radiothérapie et que symétriquement la radiothérapie peut produire des néo-antigènes tumoraux pour augmenter la réponse immunitaire. Les résultats des combinaisons sont encourageants mais ne sont pas encore à la hauteur des attentes, comme pour l'effet abscopal.

Une explication plausible est que la radiothérapie pourrait également induire une *immunosuppression*. Des mécanismes impliquant d'une part la biologie moléculaire et d'autre part la radiobiologie plus classique pourraient l'expliquer.

Immunosuppression radio-induite

Généralement, les mécanismes immunogènes peuvent aussi produire une réaction inverse dont l'effet tend à stabiliser puis stopper la réaction immunitaire:

Ainsi l'irradiation du stroma tumoral augmenterait la production des cytokines immunosuppressives comme le TGF- β . L'interprétation la plus répandue de son action est que le TGF- β restaure le caractère immunotolérant du microenvironnement tumoral en diminuant la prolifération des cellules effectrices (NK, lymphocytes T CD8+), tout en augmentant la prolifération des cellules immuno modulatrices (Treg). Cependant pour certains auteurs, le rôle du TGF- β n'est pas complètement univoque (rôle dans la différenciation des lymphocytes-mémoire?), on trouvera une revue complète dans (94).

L'irradiation tend aussi à augmenter l'expression des inhibiteurs de checkpoints (les freins immunitaires) comme le PD-L1 (95). L'irradiation pourrait aussi augmenter le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives via l'augmentation de la chimiokine CCL2 (96).

Cette liste n'est pas exhaustive et d'autres mécanismes similaires seront certainement mis au jour.

Il est donc plausible que de multiples effets moléculaires immunosuppresseurs soient enclenchés, après une courte phase initiale pro-inflammatoire liée aux dégâts dans l'ADN. Il n'est donc pas certain que l'activation de la réponse immunitaire adaptative soit durable ou même possible. Cependant, ces modèles animaux, sur des tumeurs particulières, avec des schémas d'irradiation souvent unidose ne sont pas extrapolables directement à la radiothérapie fractionnée chez l'Homme.

Mécanismes radiobiologiques d'immunosuppression

Déplétion des lymphocytes extra-tumoraux

En clinique, des lymphopénies radio-induites sont fréquentes en cas d'irradiation prolongée et s'expliquent probablement par la grande radiosensitivité des lymphocytes, qui se trouvent à la fois dans le microenvironnement tumoral mais aussi dans les ganglions de drainage, les organes de voisinage, la moelle hématopoïétique, le sang

circulant...compartiments qui reçoivent tous une dose d'irradiation plus ou moins élevée et répétée.

Les lymphocytes seraient les cellules immunitaires les plus radiosensibles: dans la littérature, leur fraction survivante à 2 Gy est une des plus basses ($SF_{2Gy} = 0.45$, soit $\alpha = 0.41 \text{ Gy}^{-1}$) et les lymphopénies induites par la radiothérapie sont une complication fréquente des irradiations prolongées (97,98).

Cette radiosensibilité est exploitée depuis longtemps dans la radiothérapie des lymphomes, dans laquelle les doses tumoricides sont nettement inférieures à celles utilisées dans les tumeurs solides (de 20 à 40 Gy pour le traitement des lymphomes, contre environ le double pour la plupart des tumeurs solides).

Des auteurs ont récemment modélisé mathématiquement l'irradiation des lymphocytes circulants et ont décrit précisément les lymphopénies rencontrées en clinique (dans le cas d'une irradiation pancréatique), et ils ont retrouvé des valeurs de radiosensitivité très proches des données de la littérature (1). Leurs travaux indiqueraient qu'une grande partie de la lymphopénie serait due à l'irradiation des organes de voisinage, dans lequel le sang circule lentement, en plus de la circulation dans les grands axes vasculaires.

Sans utiliser de modélisation, des données cliniques rétrospectives confirment que les lymphopénies radio-induites sont fréquentes en cas d'irradiation prolongée (> 5 fractions) et que le risque de décès est doublé en cas de lymphopénie profonde à l'initiation de l'immunothérapie (99). Ces données sont cohérentes avec d'autres publications, par exemple (97,98). Dans l'essai randomisé d'immuno-radiothérapie du MDACC (93), la baisse moyenne des lymphocytes était de -19% chez les patients traités par stéréotaxie en 4 fractions, mais de -47% en cas de radiothérapie conventionnelle en 15 fractions ($p=0.003$).

Dans l'essai d'immuno-radiothérapie des cancers ORL CheckRad-CD8 (irradiation cervicale conventionnelle en 33 à 35 fractions), le taux de leucopénie de grade 3 ou 4 a atteint 48% avec 29% d'infections en cours de traitement; les résultats d'efficacité sont en attente (100).

Si la causalité n'est pas certaine, il existe donc un faisceau d'indices en faveur d'un effet toxique de la radiothérapie sur le système immunitaire, qui serait potentiellement délétère pour l'efficacité des immunothérapies.

Déplétion des lymphocytes intra-tumoraux

Les mêmes arguments radiobiologiques que pour les lymphocytes circulants devraient s'appliquer, d'autant plus que les lymphocytes intra-tumoraux sont dans la zone soumise aux doses maximales de rayonnements ionisants. Cependant, comme ils ne sont pas directement observables, leur véritable destin après irradiation ne peut être inféré qu'à partir de modèles (animaux ou radiobiologiques).

Complication supplémentaire: le stroma tumoral est composé de cellules immunitaires de polarisation *opposée*: par exemple pour les lymphocytes, les cytotoxiques (CD8+) mais aussi les immunosuppresseurs (Treg). En supposant (sur une base radiobiologique raisonnable) que la radiothérapie éradique temporairement presque tous ces lymphocytes, du moins à court terme, il est difficile de prédire quelle sera la nature du prochain équilibre entre CD8+ et Treg lors de la reconstitution immunitaire.

Pour certains auteurs se basant sur des modèles animaux (101), les Treg deviendraient majoritaires une semaine après une irradiation unique à haute dose (10 Gy). Les causes de ce phénomène pourraient impliquer le TGF- β ou le PD-L1 mais les auteurs n'ont pas pu le confirmer dans ce modèle. Quoiqu'il en soit, l'effet de stimulation immunitaire de la radiothérapie serait alors limité dans le temps. Bien sûr, l'extrapolation de ce modèle à l'Homme et à des schémas de radiothérapie fractionnés à dose plus faible est difficile.

D'autres auteurs ont affirmé récemment que les lymphocytes *intra-tumoraux* possèdent un degré de radiorésistance exceptionnellement élevé (102), à la différence des lymphocytes circulants: dans leur expérimentation, des lymphocytes intra-tumoraux auraient majoritairement résisté à une dose unique de 20 Gy (à cette dose, la fraction survivante pour une valeur de radiosensibilité $\alpha = 0.41 \text{ Gy}^{-1}$, typique des lymphocytes, est pourtant normalement inférieure à 0.03%). La viabilité et la fonctionnalité des lymphocytes a été affirmée sur leur nombre, leur motilité et leur capacité à produire de l'interféron γ , ces grandeurs étant évaluées ponctuellement peu de temps après l'irradiation; en revanche *leur capacité de prolifération était devenue nulle*, ce qui est conforme aux données établies de la radiobiologie et diminue la portée de leurs conclusions; le rationnel de cette radiorésistance supposée pourrait impliquer

l'infiltration du stroma tumoral par les cellules myéloïdes, le TGF- β ou une possible "reprogrammation moléculaire" similaire à celles des tumeurs. Les auteurs extrapolent que chez l'homme, l'irradiation locale n'est pas immunosuppressive et qu'il est donc souhaitable d'augmenter le nombre de cibles et de traiter autant de métastases qu'il est techniquement possible (103).

Outre le fait que ces conclusions soient incompatibles avec (101) et (96), leur rapport bénéfice-risque reste à établir (voir Toxicités). De plus, la pérennité de la réponse immunitaire semble compromise si les lymphocytes intra-tumoraux irradiés ne peuvent plus se diviser et d'autant plus si leur renouvellement est limité par une lymphopénie radio-induite. Enfin, les autres effecteurs immunitaires intra-tumoraux n'ont pas été étudiés, comme les cellules présentatrices d'antigènes, indispensables à l'activation et l'amplification des lymphocytes intra-tumoraux naïfs nouvellement recrutés.

La controverse scientifique est donc ouverte, il faut souhaiter que des modélisations supplémentaires ou des essais cliniques viendront clarifier si des stratégies d'irradiation maximalistes telles que celles proposées dans (103) sont pertinentes.

Pris globalement, ces résultats indiquent que la radiothérapie semble présenter un risque d'immunosuppression qui pourrait antagoniser l'efficacité des immunothérapies et représenter un frein à l'effet abscopal. Ceci n'est pas en contradiction avec un mécanisme d'efficacité de la radiothérapie partiellement immuno-dépendant, mais représente probablement un des freins à lever. Là encore, des modélisations radiobiologiques seraient utiles, afin de synthétiser de nombreux résultats obtenus sur modèles animaux.

Toxicités

Une synergie toxique?

Le profil de toxicité de la radiothérapie est généralement connu statistiquement, surtout si elle est utilisée en monothérapie et dans une moindre mesure quand elle est combinée à certaines chimiothérapies; des méthodes rigoureuses existent pour maintenir les fréquences de ces toxicités dans des limites tolérables (voir supra): elles consistent surtout à optimiser la conformité de l'irradiation pour limiter au maximum les volumes d'organes sains irradiés; en deuxième intention des concessions de dose peuvent être nécessaires.

Le profil de toxicité des immunothérapies commence à être mieux cerné; son spectre est plus large que celui de la radiothérapie, puisque ses complications sont auto-immunes (irAE: immune-related adverse event) et touchent de nombreux organes, sans lien avec la localisation tumorale (104).

Le plus souvent ces toxicités sont mitigées en excluant *a priori* les patients aux antécédents de maladie auto-immune, par l'usage de stéroïdes quand les irAEs surviennent, par une interruption temporaire ou parfois définitive de l'immunothérapie.

Cependant, cette approche empirique n'est pas optimale: dans le cancer du poumons NPC métastatique, on sait depuis peu que les patients atteints par des maladies auto-immunes peuvent recevoir des inhibiteurs de checkpoint sans nécessairement exacerber leur maladie, que l'usage des stéroïdes *à l'initiation* du traitement serait un facteur pronostic indépendant péjoratif pour la survie (avec un effet dose mesurable dès les faibles doses), et que le traitement peut souvent être repris après résolution, sans récurrence de l'effet secondaire, dans environ 50% des cas, et sans aggravation en cas de récurrence (105). La gestion des irAEs semble actuellement prête à évoluer dans le sens d'un élargissement des indications des immunothérapies, une plus grande tolérance vis-à-vis de l'occurrence des irAEs, avec des rechallenges, l'emploi dynamique de stéroïdes. La fréquence des irAE aura donc tendance à augmenter, à mesure que l'aversion au risque des prescripteurs diminue.

Cette tendance pourrait compliquer la gestion des irAEs en combinaison avec la radiothérapie. Actuellement, les toxicités des combinaisons de radiothérapie avec les immunothérapies ne sont pas encore connues: si certains auteurs affirment, peut-être un peu vite, que cette toxicité serait superposable aux données de monothérapie (75), pour d'autres ces toxicités restent largement à découvrir (88). A l'heure actuelle, les données de toxicités prospectives viennent encore majoritairement d'essais précoces avec de petits effectifs, parfois sans bras contrôle (106).

Des arguments biologiques existent pour supporter l'hypothèse que les immunothérapies peuvent aggraver les toxicités aiguës et tardives de la radiothérapie.

On a vu précédemment que la radiothérapie, même à basse dose (0.1 - 1 Gy par fraction) pourrait entraîner des mécanismes inflammatoires, et que ces niveaux de dose concernent les organes de voisinage de la tumeur, surtout en cas de radiothérapie externe en conditions non stéréotaxique, avec des gradients de dose faible. L'ajout d'une

immunothérapie pourrait théoriquement induire une réponse immunitaire délétère dans ces organes de voisinage.

Le rôle du système immunitaire dans le processus de cicatrisation est également essentiel: l'inflammation puis la réponse immunitaire doivent, après élimination du pathogène, promouvoir la cicatrisation et la restauration des tissus lésés, partiellement ou *ad integrum*. En inhibant les freins de la réponse immunitaire, les ICI peuvent donc altérer cette cicatrisation. Ainsi l'expression des checkpoints PD1-PDL1 dans les cellules des tissus sains a été jusqu'ici peu explorée, les modèles précliniques ayant jusqu'ici cherché à expliquer quasi-exclusivement les mécanismes d'efficacité anti-tumorale des immunothérapies.

En conséquence, les dommages tissulaires causés par la radiothérapie sont donc susceptibles d'être moins réparés en cas de combinaison avec immunothérapie.

Or, les doses usuelles de radiothérapie sont normalement les doses maximales déterminées en fonction des tolérances des organes à risque: il n'existe que peu de "marge de manœuvre" à la hausse en cas de potentialisation des effets toxiques. La question de la concession posologique sur la radiothérapie (ou sur l'immunothérapie, ou sur les deux) est donc ouverte.

Une complication chronique de la radiothérapie fréquente est la fibrose radio-induite. Elle résulte de dommages microvasculaires entraînant hypoxie, nécrose, inflammation puis des phénomènes cicatriciels avec production de collagène; le processus peut être auto-entretenu et progresser pendant des années après l'irradiation. Le TGF- β , produit dans tous les tissus irradiés, s'oppose à l'inflammation en créant un environnement immunotolérant, qui stimule la production de collagène et contribue à la fibrose (107). Cette voie de signalisation représente donc une piste dans la mitigation des irAEs.

En résumé, pour diminuer ces toxicités, on pourrait donc considérer des baisses de dose de radiothérapie et/ou d'immunothérapie, des fractionnements différents, des volumes d'irradiation plus réduits, l'emploi de thérapies ciblées (comme des antagonistes du TGF- β), l'emploi de radioprotecteurs, le développement de biomarqueurs prédictifs des irAEs.

Des modèles animaux ou radiobiologiques de toxicité de l'immuno-radiothérapie seraient utiles. Certains auteurs ont créé un modèle animal de pneumopathie radio-induite, mais sans immunothérapie pour le moment (108). Les modèles radiobiologiques classiques n'ont jusqu'ici pas été adaptés pour produire des limites de

doses valables en immuno-radiothérapie, (comme c'est le cas pour la chimio-radiothérapie). Le formalisme des histogrammes dose-volume n'est pour le moment pas adapté à l'immuno-radiothérapie.

Fréquence des irAEs et nombre de lésions traitées

Les effets secondaires immunologiques semblent logiquement augmenter avec le nombre de lésions traitées par immuno-radiothérapie.

Ainsi dans une étude prospective non randomisée où l'on a comparé des patients sous inhibiteurs de checkpoints irradiés sur 2 à 5 métastases contre des patients avec une seule métastase irradiée (109), les effets secondaires immunologiques sont presque triplés dans le groupe 2 à 5 métastases par rapport au groupe mono-métastase: 11 sur 27 (41%) vs 4 sur 23 (17%), $p=0.07$.

Dans une étude prospective randomisée sur des patients atteints d'un cancer ORL en récurrence, sous immunothérapie (nivolumab), où une seule lésion était irradiée (110), les toxicités de haut grade étaient similaires entre le bras nivolumab et le bras nivolumab-SBRT (13.3% vs 9.7%, $p=0.70$).

Pris globalement, ces résultats reflètent une corrélation positive entre le nombre de cibles irradiées et la fréquence des effets secondaires immunologiques, impliquant un effet de volume, comme pour les complications radiobiologiques classiques.

Fréquence des irAEs et dose de radiothérapie

Il n'existe sur ce sujet que très peu de données cliniques, car les doses de radiothérapie utilisées en immuno-radiothérapie sont dans la grande majorité des cas des doses ablatives.

L'essai clinique de Ratnayake et al représente une exception (111): pour des patients atteints de mélanome métastatique et traité par inhibiteurs de checkpoint de type anti PDL1 et/ou anti CTLA 4, les auteurs ont comparé deux doses uniques non-ablatives de 10 Gy et 15 Gy. Les auteurs trouvent une augmentation des toxicités de grade 3 pour 15 Gy: dose 10 Gy, 1 sur 10 (10%) vs dose 15 Gy, 4 sur 14 (29%), $p=0.36$, test exact de Fisher.

Ces résultats, non significatifs statistiquement, sont générateurs d'hypothèses mais seraient à confirmer avec des études de plus forte puissance et moins de biais. Par exemple, les sites d'irradiations étaient variables selon les patients, certains recevaient

une mono immunothérapie mais d'autres une combinaison d'immunothérapie. Ces facteurs confondants n'ont pas été analysés en raison des petits effectifs.

La survie sans progression semble avoir été plus importante dans le bras ayant reçu la dose plus faible de 10 Gy; les auteurs évoquent des arguments biologiques impliquant l'activation de l'exonucléase Trex, mais les nombreux biais pourraient contribuer aussi aux différences d'efficacité.

Récemment, l'équipe de S. Formenti a documenté les effets d'un traitement sous-ablatif (3 x 8 Gy sur 3 jours consécutifs) en néoadjuvant dans le cancer du poumon en combinaison avec le durvalumab (112), sans trouver de sur-toxicité par rapport au durvalumab monothérapie.

Ces études ont le mérite d'ouvrir le débat sur l'utilisation de doses sous-ablatives en immuno-radiothérapie. Cependant, faut-il prendre le risque d'un mauvais contrôle local si une immunothérapie, à l'efficacité *a priori* versatile, est combinée? Nous verrons que les deux modèles mathématiques présentés dans cette thèse cherchent à intégrer les immunothérapies dans le champ de la radiobiologie classique et nous pensons qu'il ne sera pas nécessaire de diminuer le contrôle local pour augmenter l'immunogénicité, ceci sera développé en particulier dans le deuxième modèle.

Pneumopathies auto-immunes

Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NPC), la combinaison entre radiothérapie stéréotaxique et inhibiteurs de checkpoint augmenterait significativement le taux de pneumopathie auto-immune *de haut grade* (G3 ou plus): Tian et al (113) ont reporté (rétrospectivement) un taux de 10.7% pour la combinaison immuno-radiothérapie contre 0% pour la radiothérapie seule ($p < 0.01$), malgré le respect des contre-indications à l'immunothérapie et des contraintes de dose aux poumons (technique: SBRT). Cette fréquence est aussi nettement supérieure au taux de pneumopathie auto-immune observé sous immunothérapie seule (de type anti-PD1), qu'une méta-analyse estime à 4.1% (IC 95%: 2.4 - 6.3) pour les pneumopathies *tous-grades* dans le cancer du poumon NPC traité par anti-PD1 en monothérapie (65): comme les pneumopathies de haut-grade n'en représentent qu'une fraction minoritaire, on peut donc les estimer à quelques pourcents.

Une analyse rétrospective de l'étude KEYNOTE-001 (pembrolizumab dans le cancer du poumon NPC métastatique) a également montré une augmentation des

pneumopathies auto-immunes en cas d'antécédent d'irradiation thoracique (mais avec des effectifs non significatifs)(114).

Dans l'étude Pembro-RT (92), un doublement des pneumopathies et des dyspnées auto-immunes de tout grade est observée dans le groupe SBRT + pembrolizumab par rapport au groupe pembrolizumab. Le site d'irradiation majoritaire était intra-thoracique (à 55%). En raison du petit effectif, ces résultats étaient non significatifs. On observe aussi dans le bras combiné un *triplement* du taux de pneumopathies supposées non auto-immunes (26% vs 8% $p=0.06$), ce qui pose question³¹ et aurait mérité des clarifications.

Dans l'étude du MDACC (93), les effets secondaires liés au traitement ne sont pas significativement plus élevés pour le groupe combiné pembrolizumab et radiothérapie, mais les effets secondaires non attribués au traitement par les investigateurs ne sont pas mentionnés (comme le taux de pneumopathie *toutes causes*).

Dans l'étude PACIFIC (115), 20% de pneumopathie radique tous grades dans le bras durvalumab vs 16% dans le groupe placebo ($p=0.16$ test khi-2), et 1.5% vs 0.4% pour les grades 3-4 ($p=0.16$, test khi-2³²): non statistiquement significatifs, ces résultats pourraient faire discuter une *tendance* à l'augmentation des pneumopathies sous durvalumab.

Dans l'étude (non contrôlée) NICOLAS, nivolumab concomitant avec radiochimiothérapie, 42.5% de pneumopathies tous grades, 10% de G3, 0% de G4, sans lien avec la dose moyenne aux poumons ou la V20 (116).

Globalement, avec les réserves liées aux données rétrospectives ou aux petits effectifs, et en l'attente de méta-analyses ou d'essais prospectifs de plus grand effectif, on soupçonne une potentialisation des effets secondaires, plutôt qu'une simple addition des toxicités.

Lymphopénies et leucopénies

Les lymphopénies ont été évoquées en détail dans le chapitre sur les toxicités de la radiothérapie. Il n'existe pas encore d'arguments pour savoir si une potentialisation par l'immunothérapie existe.

³¹ Dans les pneumopathies en contexte radique, la distinction entre inflammation et infection n'est pas toujours possible, les deux causes sont fréquemment impliquées et le traitement est souvent une combinaison de stéroïdes et d'antibiotiques, visant à traiter les deux causes à la fois.

³² L'approximation du khi-2 est valable en raison du grand effectif, par rapport au test de Fisher.

Dysphagie

La dysphagie est une complication difficile à traiter de l'irradiation cervicale dans les cancers ORL, pouvant nécessiter le recours à une nutrition entérale, ainsi que dans l'irradiation thoracique dans les cancers du poumons (117). Elle est favorisée par la dose reçue par les muscles constricteurs du pharynx et par le larynx en radiothérapie ORL, et par la dose à l'oesophage en radiothérapie thoracique. En combinaison avec un double blocage PDL1 et CTLA 4 (durvalumab et tremelimumab), le taux de dysphagie de grade 3 ou 4 monte à 53% dans l'essai ORL toutes localisations CheckRad-CD8 selon une étude préliminaire (100). Il n'est pas précisé s'il s'agit des toxicités aiguës ou tardives, les résultats définitifs sont en attente.

Ce chiffre brut semble élevé, dans l'absolu et relativement au traitement standard: une étude dosimétriques de chimio-radiothérapie des cancers de l'oropharynx a montré que la probabilité de complication tardive ne dépasse 30% que dans des situations rares où la dose moyenne aux muscles constricteurs du pharynx excède 65 Gy ou quand la dose moyenne au larynx excède 60 Gy (118). On surveillera donc le taux de dysphagie tardive de CheckRad-CD8 quand il sera reporté. Les données de NTCP³³ seront alors possiblement à réévaluer en immuno-radiothérapie.

Autres toxicités

Celles-ci impliquent principalement la peau, le colon, le foie. Peu de données existent actuellement sur les combinaisons immuno-thérapie-radiothérapie, mais des essais sont en cours et de nouvelles données sont imminentes.

Essais cliniques publiés et en cours

Les essais en cours sont désormais très nombreux, on ne pourra tous les citer. Initialement concentrées sur les patients métastatiques à faible masse tumorale (oligo métastatiques), les recherches s'orientent vers des stades plus précoces, comme la maladie localement avancée et le néo-adjuvant.

Ainsi l'essai de phase III PACIFIC dans le cancer du poumon non à petites cellules localement avancé traité par chimio-radiothérapie, avec l'ajout d'un anti-PD-L1 en séquentiel (119), a montré une augmentation cliniquement et statistiquement significative de la survie sans progression, en dépit d'un schéma d'administration

³³ NTCP: Normal Tissue Complication Probability

séquentiel théoriquement non-optimal. Une analyse en sous-groupe a montré une efficacité plus grande lorsque l'immunothérapie est commencée moins de 2 semaines après la fin de la radiothérapie. Aussi, l'essai de phase III PACIFIC-2, en cours, cherchera à évaluer une chimio-radiothérapie *concomitante* avec le durvalumab (NCT03519971). L'association concomitante du nivolumab avec une chimio-radiothérapie a été évaluée dans NICOLAS, une phase II non contrôlée.

L'essai PACIFIC-3, en cours, cherche à évaluer le durvalumab associé à la radiothérapie stéréotaxique des cancers pulmonaires localisés sans atteinte ganglionnaire.

D'autres essais de phase III chercheront également à valider le principe d'un inhibiteur de checkpoint *concomitant* avec une radiochimiothérapie (NCT03745222 RATIONALE 001). Dans l'essai NCT03774732 (NIRVANA-Lung), une irradiation de la tumeur primitive (totale ou partielle, selon la taille), concomitante au pembrolizumab, sera évaluée chez des patients atteints d'un cancer du poumon NPC métastatique.

Dans le cancer du poumon NPC au stade précoce en néoadjuvant³⁴, une phase II randomisée (112) a montré une forte augmentation du taux de réponse pathologique complète après stéréotaxie et durvalumab concomitant (27%) vs durvalumab seul (0%) et un taux de réponse pathologique majeure également très supérieur (53% vs 7%, $p < 0.001$). Cependant, l'effet de la radiothérapie seule n'a pas été évalué dans cet essai et il est potentiellement majeur puisque dans cette catégorie de patients, la stéréotaxie seule (mais à plus haute dose³⁵), offre des taux de contrôle local supérieurs à 80%, comparables à la chirurgie³⁶. A la lumière de ces résultats, on peut se demander si la stéréotaxie à dose réellement ablative, combinée à l'immunothérapie concomitante, pourrait un jour supplanter la chirurgie dans cette indication³⁷.

Dans le cancer du rectum, l'essai non contrôlé AVANA a testé en néoadjuvant l'ajout de l'avelumab à la radiochimiothérapie normo fractionné classique (50.4 Gy en 28 séances + capécitabine, ou CAP50), le taux de réponse pathologique complète (ypCR) est 23%, mais de seulement 8% pour les patients sans instabilité microsatellitaire (MSS). Ces résultats sont à mettre en perspective avec un taux de réponse pathologique

³⁴ traitement néoadjuvant : traitement pré-chirurgical

³⁵ Plusieurs schémas existent, par exemple 12 Gy x 4 (48 Gy) ou 18 Gy x 3 (54 Gy).

³⁶ On pourrait envisager de clarifier l'apport de chaque composante par des méthodes de micro-simulations avec des modèles de Markov, comme présenté plus haut.

³⁷ Il faudrait éviter l'activation de la voie de l'exonucléase Trex (par exemple avec 10 Gy x 5), et maîtriser la tolérance et les irAEs avec une escalade de dose sur l'immunothérapie.

complète (ypCR) de 13.9% avec une radiochimiothérapie de type CAP45 dans l'essai ACCORD12 pour des patients globalement comparables (sans précision de statut microsatellitaire). Ces résultats pourraient en fait traduire une utilité restreinte aux patients avec instabilité microsatellitaire (MSI), censés être meilleurs répondeurs à l'immunothérapie. Une randomisation avec un bras contrôle est donc nécessaire pour clarifier. La question de l'immunogénicité des schémas normofractionnés est aussi posée (voir deuxième article). Il serait intéressant d'utiliser le fractionnement de l'essai CR07 (120) en 5 Gy x 5, plus proche des schémas "immunogènes" prônés par l'équipe de Silvia Formenti, entre autres.

De nombreux essais randomisés dont plusieurs phases III sont en cours, dont les résultats sont attendus dans plusieurs années.

Pris dans leur ensemble, les résultats en néoadjuvant montrent que les schémas concomitants sont prometteurs mais leur bénéfice reste à établir et il est possible que des fractionnements différents doivent être utilisés pour réellement potentialiser les deux modalités.

Tendances actuelles

Certaines voies de signalisation moléculaires impliquées dans la résistance à la radiothérapie pourraient être de futures cibles thérapeutiques: activation du facteur de croissance TGF β , recrutement de lymphocytes T régulateurs.

Le ciblage individuel des lésions cancéreuses (primitives et métastases) par les techniques de radiothérapie modernes, permet de réduire partiellement le fardeau tumoral: cette action, même sans immunothérapie, peut améliorer significativement le pronostic, comme l'ont montré plusieurs essais randomisés, dans diverses tumeurs solides (121–123). Pour certains auteurs (75), ces résultats suggèrent que l'élitage (*debulking*) de la masse tumorale permet au système immunitaire de reprendre, temporairement, le contrôle de la maladie résiduelle, et qu'il faut poursuivre dans cette voie en ciblant un maximum de métastases et en potentialisant le système immunitaire par l'adjonction d'immunothérapies.

Ainsi, dans un nombre croissant de centres, le nombre maximal de lésions irradiées au niveau cérébral a fortement augmenté: le nombre médian de lésions cérébrales traitées chez un même patient peut ainsi dépasser 30 avec des techniques d'épargne hippocampique (124), tandis que les dernières recommandations européennes incitent

désormais à traiter jusqu'à 10 métastases cérébrales en pratique courante (125). Il existe donc une tendance de fond pour offrir au patient métastatique des traitements locaux de plus en plus souvent. Des techniques de radiothérapie actuellement émergentes comme la stéréotaxie guidée par une IRM embarquée devraient accroître encore les possibilités, en supprimant la nécessité de placer des repères métalliques à proximité de la cible et en permettant une visualisation optimale des tissus mous.

L'immuno-radiothérapie pourra donc se développer en capitalisant sur des possibilités techniques appelées à se développer dans les prochaines années.

Mais ce domaine émergent est actuellement limité par le nombre encore limité d'oncologues-radiothérapeutes expérimentés en immuno-radiothérapie. Les standards de traitement ne sont pas établis, les profils de toxicités encore non connus et une frilosité naturelle en découle, hors des centres experts avec une expérience déjà significative.

Le développement de ces techniques pourra faire appel à des technologies innovantes de suivi de la réponse immunitaire sous immuno-radiothérapie, comme l'analyse de l'ADN tumoral circulant, des exosomes, du répertoire des lymphocytes T. L'intelligence artificielle pourrait également fournir des biomarqueurs non invasifs basés sur l'imagerie (ou *radiomics*)(8), qui permettraient de distinguer environnement tumoral "chaud" ou "froid" et de proposer des prises en charge adaptées à chaque cas.

Enfin, des modèles mathématiques permettront peut-être, à terme, de proposer une méthodologie permettant une prescription plus rationnelle et sécurisée en immuno-radiothérapie, en dépassant les modèles animaux. Ce fut l'objet de ce travail de modélisation, qui se présente en deux modèles : le premier, assez complet, représente une première étape d'abstraction pour passer du modèle animal au modèle numérique. Le deuxième modèle, plus épuré, est à vocation plus pratique et cherche à définir mathématiquement l'immunogénicité intrinsèque d'un schéma d'irradiation pour créer une "boussole" servant à s'orienter dans l'ensemble de toutes les combinaisons possibles de dose par fraction, de dose totale et d'étalement. Leurs hypothèses, leurs limites, leurs enseignements sont présentés dans la suite.

Premier article

“Mathematical modeling of cancer immunotherapy and its synergy with radiotherapy” ou Modélisation de l’effet synergique entre immunothérapie et radiothérapie dans le traitement du cancer. Introduction, présentation du modèle mathématique

Présentation du modèle mathématique

Dans un souci de clarté, on présente d’abord le modèle en français, mais sans sacrifier à la rigueur de la description. Le formalisme mathématique est présenté en détail dans la reproduction de l’article publié, avec toutes les données supplémentaires permettant de reproduire les résultats (dont les valeurs des paramètres du modèle).

Dans ce travail de modélisation est défini un système dynamique (dépendant du temps) constitué d’une tumeur cancéreuse en croissance, en interaction avec son micro environnement, qui n’est constitué ici que du système immunitaire, décrit par une population de cellules effectrices (de nature non spécifiée). La **figure 1** donne une représentation de ce système dynamique.

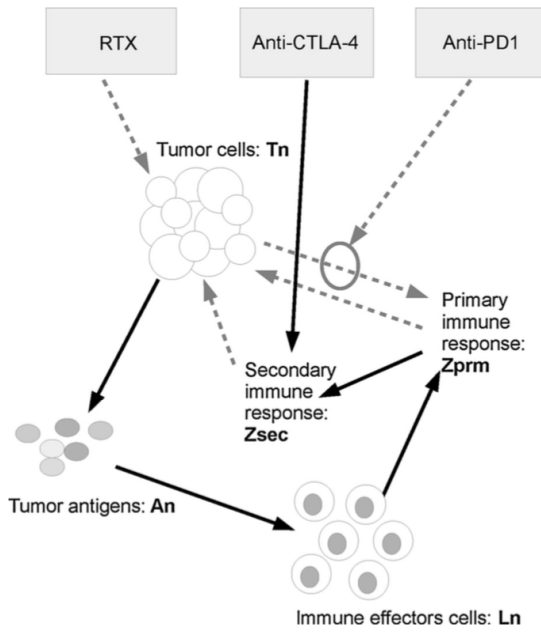


Figure 1. Schematic representation of the relations between the components of the proposed mathematical model. Tumor antigens (An) are produced either naturally by the tumor cells (Tn) or by the radiation cell kill. They induce the production of immune effector cells (Ln) that exert a cytotoxic effect on the tumor cells via an immunologic attack that is composed of a primary and a secondary response. The primary response can be downregulated by the tumor via the production of PD-L1, and this tumor inhibition can be mitigated by inhibitors of the PD1-PDL1 axis. The secondary response cannot be downregulated by the tumor and has a long-lasting effect. The secondary response is dependent on the intensity and duration of the primary response and can be potentiated by inhibitors of the CTLA4 pathway. Arrows with a solid line symbolize a relation of stimulation, whereas arrows with a dotted line symbolize a relation of inhibition.

Le nombre de cellules tumorales est supposé croître avec un temps de doublement constant (selon une loi exponentielle). Au cours de ce processus, certaines cellules cancéreuses meurent, soit spontanément et en “petite” quantité, soit en plus grande quantité sous l’action de la radiothérapie.

Equation de la dynamique du volume tumoral (Tn):

$$T_{n+1} = S_n(\mathbf{d}) \cdot T_n \cdot e^{\mu - Z_{\text{prm},n} - Z_{\text{sec},n}}$$

L’action cytotoxique de la radiothérapie est représentée par la proportion (Sn), entre 0 et 1, la croissance est exponentielle mais potentiellement ralentie par l’action du système immunitaire (Zprm et Zsec: détails plus bas).

Comme on l’a vu dans la section sur les notions de cancérogenèse, la mort spontanée des cellules cancéreuses s’explique par une inadéquation entre leurs besoins en

ressources (oxygène, acides aminés, sucres...) et leurs apports, qui sont fournis par le micro-environnement et par l'intermédiaire de la néo-vascularisation tumorale. Ainsi se constituent les centres nécrotiques au centre des grandes tumeurs (lorsqu'elles atteignent plusieurs cm de diamètre), tandis que la bordure invasive continue de progresser.

Par simplicité, cette vascularisation tumorale n'a pas été représentée mathématiquement, mais elle pourrait l'être, par exemple pour étendre la modélisation aux combinaisons entre les immunothérapies et les médicaments *antiangiogéniques*. La représentation mathématique de cette mort cellulaire spontanée repose sur un seul paramètre, supposé constant, qui décrit la proportion de cellules cancéreuses qui meurt spontanément par unité de temps. C'est en modifiant ce paramètre, que l'on pourrait par exemple modéliser l'effet d'un médicament antiangiogénique, sans apporter de modification à la structure du modèle.

De cette mort cellulaire tumorale s'ensuit la production d'antigènes tumoraux (issus du métabolisme des débris cellulaires) qui stimulent l'activité anti-tumorale des effecteurs immunitaires. Ces antigènes tumoraux sont représentés par une grandeur mathématique dynamique qui progresse avec la masse tumorale. On suppose qu'ils disparaissent au cours du temps selon une loi de décroissance exponentielle, avec une certaine demi-vie. Biologiquement, cette clairance des antigènes est un reflet simplifié d'un métabolisme cellulaire complexe.

L'effet de la radiothérapie est de tuer les cellules cancéreuses (et les effecteurs immunitaires au voisinage), en fonction de la dose administrée, selon le modèle linéaire-quadratique déjà présenté. Ce modèle est valide jusqu'à des doses par fraction de 6 ou 8 Gy, au-delà des ajustements à cette formule sont nécessaires (mais on peut aussi augmenter le rapport α/β).

La mort cellulaire induite par la radiothérapie n'est pas immédiate et intervient généralement après un certain nombre de mitoses; ceci n'est pas pris en compte dans la formulation classique du modèle linéaire-quadratique, qui suppose que l'on se trouve suffisamment à distance de l'irradiation pour que toutes les cellules censées mourir aient disparu. Cependant les données expérimentales à notre disposition étaient de court terme, de quelques jours à quelques semaines et il était important de pouvoir décrire des variations de volume tumoral sur cet horizon de temps. Nous avons donc modifié légèrement le modèle linéaire quadratique pour décrire une mort cellulaire qui

s'étale progressivement sur quelques jours. Les aspects mathématiques sont disponibles dans les données supplémentaires.

Dans ce modèle, les cellules tumorales tuées par la radiothérapie libèrent des antigènes tumoraux qui viennent s'ajouter aux antigènes tumoraux produits par la mort spontanée. Cette sommation ne s'effectue pas de manière équilibrée (*dans laquelle 1 unité d'antigène produit par la radiothérapie aurait le même effet que 1 unité d'antigène produit par la mort spontanée*). En réalité, afin de décrire les résultats expérimentaux, il a été nécessaire d'introduire une pondération très importante au profit de la radiothérapie: pour une cellule cancéreuse tuée, la quantité d'antigènes "immunogène" produit par la radiothérapie, serait plus de 100 fois supérieure à la quantité produite par une mort spontanée. Ceci reflète possiblement la différence d'immunogénicité entre la mort programmée par apoptose et la mort par nécrose, plus fréquente en cas d'irradiation.

Dans les expériences que nous avons cherché à décrire, les doses par fraction étaient importantes (> 6 Gy), provoquent des dégâts vasculaires, de la nécrose et sont particulièrement immunogènes. Il n'est donc pas surprenant que ce type de radiothérapie soit particulièrement immunogène. Ce modèle mathématique permet de mieux prendre la mesure du potentiel d'immunogénicité qui pourrait être libéré grâce à la radiothérapie, qui semble supérieure à l'immunogénicité spontanée d'une tumeur laissée à sa propre croissance.

Cependant les antigènes tumoraux ne représentent qu'un potentiel d'immunogénicité, qui ne se traduit pas automatiquement par une efficacité anti-tumorale: dans ce modèle, l'action des effecteurs immunitaires a été modulée par la masse tumorale. A mesure qu'une tumeur grandit, il est établi qu'elle s'affranchit progressivement du contrôle du système immunitaire: ce phénomène est soupçonné depuis le début du 20ème siècle et prouvé depuis les années 1970 lorsqu'il a été décrit dans plusieurs expériences animales.

La **figure 2** montre ainsi la probabilité de rejeter une métastase dans des conditions expérimentales, en fonction de la durée écoulée depuis l'implantation de la tumeur (durée liée à la taille tumorale, selon une loi approximativement exponentielle); les valeurs mesurées sont tirées de (36) et indiquées par les cercles, la ligne qui joint ces valeurs expérimentales montre le résultat du modèle mathématique.

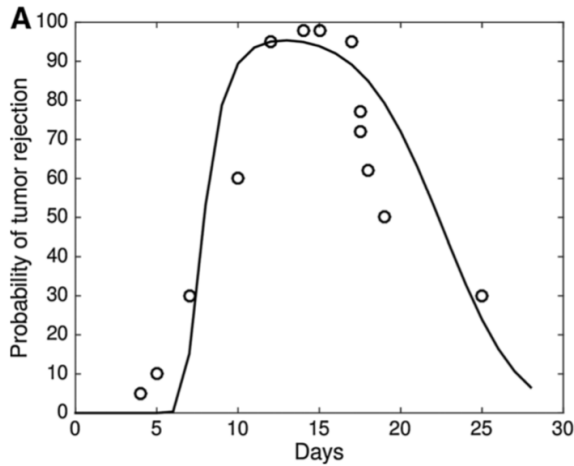


Figure 2.

On sait désormais qu'un grand nombre de facteurs contribuent à cet échappement immunitaire, comme la sélection de clones faiblement immunogènes, l'apparition dans l'environnement péri-tumoral de cellules immunitaires polarisées négativement (dont l'action tend à antagoniser la réponse immunitaire) comme les Treg, les MDSC, ou les macrophages-M2 (voir la présentation plus détaillée dans la section sur l'immunothérapie) Ainsi le système immunitaire est progressivement "éteint" dans l'environnement tumoral, et la tumeur peut croître sans rencontrer de résistance (autre que ses ressources limitées). En d'autres termes, l'échappement immunitaire est une condition nécessaire de la croissance tumorale.

Ainsi, plutôt que de décrire l'ensemble de tous les effecteurs immunitaires et leurs interactions complexes, il a été choisi de décrire l'échappement immunitaire uniquement par une traduction macroscopique: la taille tumorale.

Une relation liant les effecteurs immunitaires et la taille tumorale a donc été introduite, puis ses paramètres ont été calibrés sur des données expérimentales publiées.

Cette relation est traduite par l'intermédiaire des antigènes tumoraux, produits en majeure partie par irradiation d'une part et par le taux de mort cellulaire spontanée au sein de la tumeur d'autre part.

Equation de la dynamique des antigènes tumoraux (A_n):

$$A_{n+1} = (1 - \lambda).A_n + \rho.T_n + \psi.(1 - S_n(\mathbf{d})).T_n$$

Le premier terme décrit la clairance des antigènes, le second terme la production des antigènes de par l'apoptose ou la nécrose spontanée des cellules tumorales (T_n), le dernier terme décrit la production d'antigènes par les cellules tuées par la radiothérapie.

Les antigènes tumoraux modulent la présence d'une population d'effecteurs immunitaires au sein du microenvironnement tumoral (effecteurs immunitaires qui peuvent être temporairement détruits par irradiation, ce qui tient compte du fractionnement).

Equation de la dynamique des effecteurs immunitaires (L_n):

$$L_{n+1} = (1 - \phi) \cdot \delta_n \cdot L_n + \lambda \cdot A_n$$

Le premier terme décrit la clairance des effecteurs, qui peut être spontanée et progressive (leur durée de vie étant limitée) ou provoquée et brutale, de par l'irradiation du micro-environnement tumoral.

Ceci crée une relation positive entre l'immunogénicité et la masse tumorale, du moins dans la phase *initiale* de la croissance tumorale; cette relation décrit aussi une stimulation positive de l'immunité par l'irradiation.

Cette population d'effecteurs immunitaire voit ensuite sa *polarisation* modulée par la taille tumorale: à mesure que la tumeur croît, la proportion d'effecteurs immunitaires à polarisation positive diminue, au profit d'effecteurs inactifs, polarisés négativement.

Ceci crée une relation biphasique entre l'immunogénicité et la taille tumorale: après une période initiale de croissance conjointe entre la taille tumorale et l'immunogénicité, vient un plateau puis une chute brutale de la réponse immunitaire anti-tumorale, au-delà d'une taille critique.

Ce modèle suppose donc qu'il existe un point de non-retour, au-delà duquel une masse tumorale n'est plus contrôlable par le système immunitaire, quel que soit le degré de stimulation antigénique.

Dans ce modèle, les très petites tumeurs sont trop peu immunogènes pour produire une réponse immunitaire. Les simulations numériques montrent que la taille tumorale aura tendance à se stabiliser à long terme, plutôt qu'à s'annuler. C'est un comportement lié au modèle, mais en réalité, il est possible que le système immunitaire soit capable d'une éradication complète de la maladie.

Il existe également un plateau de réponse immunitaire aux environs d'une taille tumorale optimale, où le rendement immunologique de l'irradiation est maximum. En

pratique, ceci plaide pour irradier suffisamment de cibles en immuno-radiothérapie et de tenir compte de la masse totale irradiée.

La réponse immunitaire s'oppose à la croissance tumorale avec une action cytotoxique. Cette réponse est composée de deux composantes additives, l'une décrivant une réponse immunitaire *primaire*, l'autre une réponse immunitaire *secondaire*.

Equation de la réponse primaire:

$$Z_{\text{prm},n} = \frac{\omega \cdot L_n}{1 + \frac{\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n}{1 + p_1}}$$

Celle-ci est modulée négativement par la taille tumorale (T_n) au dénominateur, positivement par les effecteurs immunitaires (L_n), ainsi que par la concentration des inhibiteurs de checkpoint anti-PD1 (p_1).

D'un point de vue mécanistique, la réponse immunitaire primaire résulte globalement de l'activation et de l'expansion lymphocytaire T CD8+, après stimulation par l'action de l'immunité innée. Cette réponse primaire varie en fonction de la stimulation antigénique, avec une modulation de la polarisation par la taille tumorale précédemment décrite.

La réponse secondaire décrit une réponse immunitaire de long terme, qui résulte de stimulations successives de la réponse primaire. Elle est traduite mathématiquement comme une intégrale (ou somme) de la réponse primaire, pondérée par un facteur multiplicatif.

Equation de la réponse secondaire:

$$Z_{\text{sec},n} = \sum_{k=0}^n \gamma \cdot \frac{1 + c_4}{r + c_4} \cdot Z_{\text{prm},k}$$

D'un point de vue mécanistique, elle décrit de manière simple la différenciation des lymphocytes T en helpers (phénotype CD4+) et l'apparition de lymphocytes T *mémoire*. Une fois que cette réponse secondaire est apparue, elle est insensible à la modulation par la taille tumorale et elle se maintient dans le temps de manière potentiellement indéfinie. Cette réponse *secondaire* décrit donc un effet de vaccination de long terme, qui est acquis après un certain nombre de stimulations antigéniques ayant produit suffisamment de réponses primaires.

Une description de la pharmacodynamie des inhibiteurs de checkpoint anti-PD1 et anti CTLA 4 est présente dans le modèle. Il semble logique de faire porter prioritairement l'action des anti-PD1 (ou PD-L1) sur la réponse primaire, en raison du rôle de PD-1 dans l'expansion lymphocytaire T CD8+ mais aussi dans certains effecteurs de la réponse innée (NK et macrophages).

Pour les anti CTLA 4, le choix est différent: CTLA 4 inhibe la costimulation lymphocytaire T (signal 2), il est potentiellement exprimé par toutes les populations lymphocytaires (dont les T CD8+ et NK) mais il est *surexprimé* chez les lymphocytes T auxiliaires (CD4+), indispensables à l'apparition des lymphocytes T *mémoire*. CTLA 4 n'est, à notre connaissance, pas exprimé au sein des populations non-lymphocytaires (il n'a de fonction connue qu'en inhibiteur compétitif de la co stimulation du TCR). En raison de cette surexpression dans les lymphocytes auxiliaires et de son rôle de frein à la co stimulation, le choix a été fait de ne faire porter son action uniquement sur la réponse immunitaire *secondaire*.

D'un point de vue mécanistique, cette simplification néglige la part de l'action de CTLA 4 dans la réponse primaire, et c'est peut-être une limite du modèle. En pratique, l'ajout d'un terme "croisé" dans la réponse immunitaire primaire qui aurait intégré simultanément PD-1 et CTLA 4 aurait été possible mais aurait rendu la calibration du modèle plus difficile. La description des données expérimentales est d'ailleurs correcte sans introduire cette complexité supplémentaire.

Globalement, le modèle permet donc de décrire toutes les combinaisons possibles, et en particulier un blocage simple par anti-PD1 (ou PD-L1) et un double blocage anti-PD1 + anti CTLA 4, en combinaison avec de la radiothérapie. Qualitativement, l'ajout du double blocage, dans cette description, résulte en un effet relativement insensible au début, précédant l'établissement d'une réponse mémoire plus puissante.

Des simulations numériques (Figure 5) montrent que l'intérêt du double blocage est plus fort pour des tumeurs agressives avec temps de doublement très court, tandis que le simple blocage anti-PD1 combiné avec la radiothérapie est suffisant pour des tumeurs moins agressives et d'efficacité comparable au double blocage³⁸.

³⁸ Il sera intéressant de comparer ces modélisations aux données cliniques des doubles blocages anti-PD1 + anti CTLA 4 récemment autorisés en bithérapie, puisque l'utilité du double blocage a été justement questionnée par les régulateurs (EMA, HAS), comme précédemment discuté. On pourra par exemple comparer les taux de réponse en mono vs bi-thérapie en fonction de la taille tumorale et des indices de prolifération (par exemple le Ki67, ou à défaut le grade de différenciation).

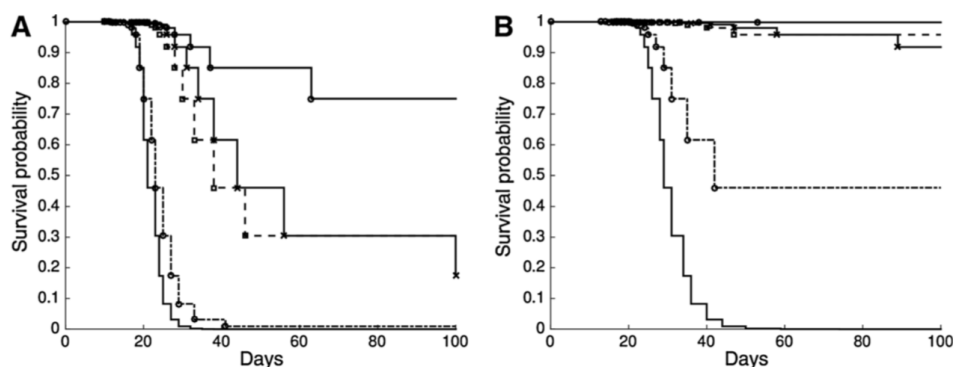


Figure 5.

Radiotherapy and concurrent PD1/PDL1 and CTLA4 blockades. Simulated Kaplan-Meier survival curves of blockade of PD1/PD-L1 axis and/or CTLA4 with or without radiotherapy (RT), inspired from the experimental results reported in ref. 14; solid line and circle marks, RT+ α -PD-L1+ α -CTLA4; solid line and cross mark, RT+ α -PD-L1; dotted line and square mark, RT+ α -CTLA4; dash-dot line and circle mark, α -PD-L1+ α -CTLA4; solid line, no treatment; unique radiation dose on day 10, immunotherapies started on day 10, and drug serum concentrations assumed to be constant from that day on. **A**, the mathematical tumor model was adjusted to yield similar long-term survival rates than those reported in ref. 14, while the long-term survival rate of the tri-therapy RT+ α -PD-L1+ α -CTLA4 was about 80%, there was <5% long-term survival if irradiation was not used, even with a dual immune blockade α -PD-L1+ α -CTLA4, as reported in ref. 14. **B**, simulated Kaplan-Meier survival curves using a less aggressive tumor, keeping the other parameters identical [$E(\mu) = 0.108$ in B vs. $E(\mu) = 0.135$ in A, where $E(X)$ stands for the expectation of the random variable X] with this smaller tumor growth rate, the long-term survival rate of the dual immune blockade α -PD-L1+ α -CTLA4 was increased to approximately 50%; however, the model predicts that RT+ α -PD-L1 and RT+ α -CTLA4 should significantly overperform the dual blockade with a long-term survival rate >80%. Numerical parameters are given in the Supplementary Material.

On discute ensuite les résultats principaux des simulations produites par ce modèle.

Discussion

Masse tumorale critique

Il apparaît que ce choix de modélisation plaide pour des stratégies de combinaison des immunothérapies avec des traitements de *debulking* (de réduction complète ou partielle) comme la radiothérapie ou éventuellement d'autres traitements cytoréducteurs: chimiothérapies, chirurgie. Ce résultat est une *conséquence logique* d'avoir lié mathématiquement l'échappement immunitaire et la taille tumorale, sur la base de données expérimentales.

Cette simplification ignore qu'à taille égale, certaines tumeurs sont infiltrées par un système immunitaire compétent alors que d'autres tumeurs évoluent au contraire dans un "désert immunitaire". Des biomarqueurs permettent d'ailleurs de prédire, certes très imparfaitement, la réponse aux immunothérapies.

Mais il ne s'agit pas d'opposer un modèle à des outils biologiques utiles mais de compléter par une modélisation dynamique.

Aussi cet hypothétique point de non-retour, cette masse tumorale critique au-delà de laquelle le système immunitaire ne peut plus contrôler la tumeur et où les traitements cytoréducteurs "traditionnels" sont indispensables. La valeur de cette masse est

probablement impossible à prédire précisément: elle est probablement tumeur-, traitement- et patient- dépendante.

Cependant, dans ce modèle mathématique, on peut tirer une expression simple pour la masse critique. En effet, pour exprimer cette masse critique, on remarque qu'elle correspond à un point d'équilibre où la croissance tumorale et la réponse immunitaire se compensent (s'égalisent). Si l'on néglige la réponse immunitaire secondaire, en première approximation, en égalisant la croissance tumorale μ (qui varie comme l'inverse du temps de doublement T_d) et la réponse primaire Z_{prm} , on en déduit une expression de la taille tumorale critique (en négligeant le terme 1 au dénominateur):

$$T_{n+1} = S_n(d) \cdot T_n \cdot e^{\mu - Z_{prm,n} - Z_{sec,n}}$$

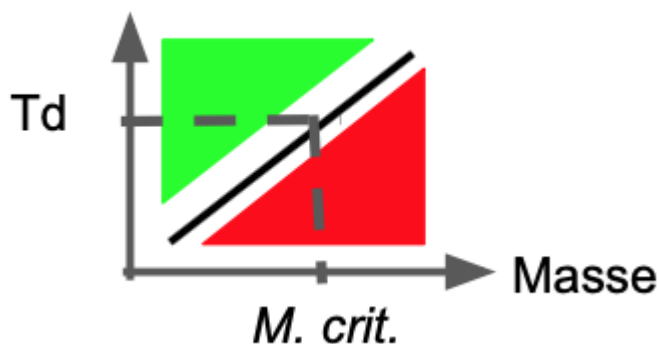
$$Z_{prm,n} = \frac{\omega \cdot L_n}{1 + \frac{\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n}{1 + p_1}}$$

$M_{critique} \sim (1 + p_1) \cdot T_d^{3/2}$

masse tumorale critique
effet ICI
temps de doublement

Cette masse critique est donc proportionnelle au temps de doublement (élevée à la puissance 3/2), et cette masse critique peut être augmentée lorsqu'un inhibiteur de checkpoint de type anti-PD1 ou anti-PDL1 est utilisé (car dans ce cas: $p_1 > 0$). A noter que, le terme p_1 vaut environ 2 dans les expériences précliniques que nous avons décrites avec ce modèle, soit un triplement de la masse critique sous anti-PD(L)1.

Ainsi, sur le schéma ci-dessous, la masse critique se situe sur une courbe (noire) passant par l'origine dans un repère (Masse tumorale , Temps de doublement). Les tumeurs dont la masse et le temps de doublement sont dans la zone verte sont contrôlables par le système immunitaire, tandis que celles dans la zone rouge échappent au système immunitaire.



L'effet des anti-PD(L)1 décale la courbe de la masse critique vers la droite, ce qui augmente la surface de la zone verte, ce qui se traduit par un contrôle immunitaire pour plus de tumeurs, toutes choses égales par ailleurs.

Il est intéressant de noter que des auteurs ont publié des schémas d'allure similaire sur des données expérimentales (126) qui lient également la réponse aux inhibiteurs de checkpoint à la taille tumorale et à un indice de prolifération (le Ki67), en cohérence avec les prédictions de notre modèle mathématique.

On reste cependant prudent sur la forme précise de cette hypothétique masse critique, mais on supposera à ce stade qu'il existerait une possible dépendance au temps de doublement, donc finalement au degré d'agressivité tumorale (plus l'agressivité est grande, plus petite est la taille tumorale critique sous ICI).

L'hypothèse que cette masse critique *existe* peut générer de nouvelles stratégies de traitement. Dans ce modèle, chez un patient progressateur sous immunothérapie, cette masse critique pourrait avoir été dépassée et il y aurait un intérêt à tenter une stratégie de *debulking*, en la combinant à une immunothérapie (nouvelle ligne ou ligne en cours). Ce debulking prend préférentiellement la forme de radiothérapie stéréotaxique à haute dose sur les lésions les plus symptomatiques, en incluant éventuellement d'autres lésions volumineuses, dans le but de créer une quantité maximale d'antigènes. Mais on pourrait évoquer d'autres justifications: évitement d'une défaillance d'organe ultérieure, limitation du risque d'apparition, de prolifération puis de diffusion de clones résistants, par exemple.

Cette stratégie a été tentée récemment, avec succès, pour des immunothérapies à base de CAR-T cells, dans les lymphomes à haut volume tumoral en progression sous chimio-immunothérapie (127); les auteurs ont bien observé des re-sensibilisations, des réponses complètes, et de manière peut-être moins prévisible, une paradoxale *diminution* des toxicités - malgré une escalade thérapeutique - , liée à la diminution du volume tumoral et donc de la fréquence des syndrome de lyse.

Une analyse rétrospective de la KEYNOTE-001 déjà citée (114) a mis en lumière une activité supérieure de l'inhibiteur de checkpoint Pembrolizumab en cas d'antécédent (même ancien) de radiothérapie. La taille tumorale au moment d'initier le Pembrolizumab n'est pas documentée dans cette étude, mais il est plausible que le fardeau tumoral était plus faible chez les patients ayant pu bénéficier d'une

radiothérapie, en particulier thoracique³⁹, par rapport aux patients traités uniquement par traitement systémique. Le rôle de potentialisation des antigènes tumoraux libérés par la radiothérapie est possible, mais, dans ce modèle, il est moins plausible à mesure que le délai entre la radiothérapie et l'immunothérapie s'allongent. Dans le cancer du poumon NPC localement avancé non opérable, les résultats positifs de l'étude PACIFIC (ajout du durvalumab) sont également cohérents (115), puisque la radio-chimiothérapie réalisée peu de temps avant de débiter l'immunothérapie a contribué à réduire le fardeau tumoral; cependant comme les patients ont été randomisés sur l'immunothérapie (et pas sur la radiothérapie), l'argument est donc moins fort que pour les études précédentes.

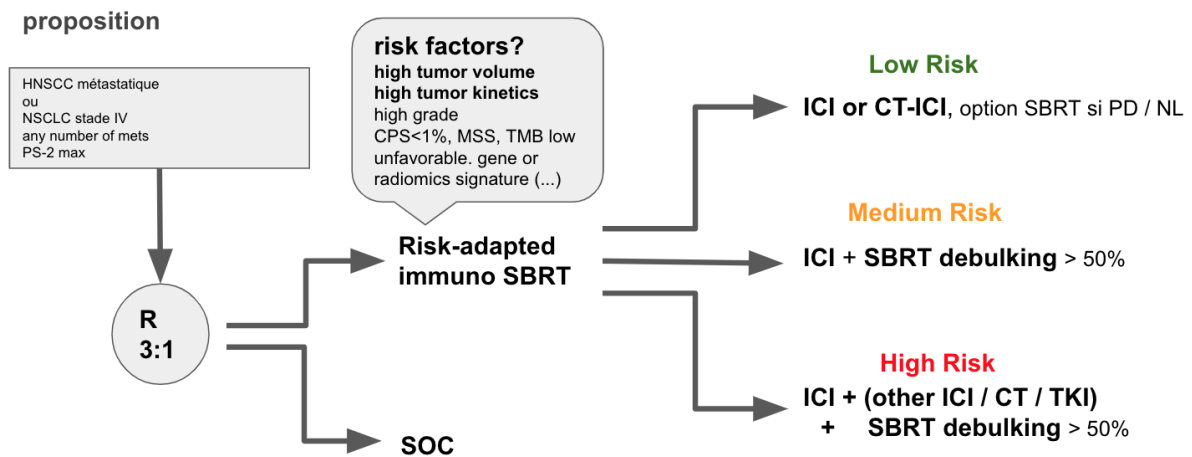
Une étude monocentrique affirme avoir montré un bénéfice en survie sans progression et en survie globale à l'irradiation de toutes les lésions combiné à des inhibiteurs de checkpoint (PDL1 ou CTLA 4) par rapport à l'irradiation d'un seul site métastatique (109). Cependant, les patients n'ont pas été randomisés, mais traités sur toutes les lésions *lorsque c'était possible*, aussi le fardeau tumoral représente un facteur confondant évident. Dans le bras toutes lésions traitées, aucun patient n'avait 6 métastases ou plus, contre 48% pour les patients dans le bras où une seule lésion était traitée. Les auteurs n'ont pas analysé le nombre de lésion dans l'analyse multivariée, ni stratifié par nombre de métastases, le niveau de preuve est donc faible.

Dans une étude prospective randomisée où une seule métastase était irradiée chez des patients atteints d'un cancer ORL métastatique sous immunothérapie, aucun effet bénéfique n'a été mesuré sur le taux de réponse, la survie sans récurrence, la survie globale ou la durée de réponse (110). Dans une étude en cours sur la même population de patients atteints d'un cancer ORL sous ICI, un volume minimum à irradier a été imposé (au moins 10 cc) et pourra intéresser jusqu'à 3 métastases (NCT03386357: Keynote 717, IMPORTANCE), reflétant probablement une volonté des investigateurs d'augmenter la quantité d'antigènes tumoraux produits par l'irradiation, tout en limitant les effets secondaires.

Pris dans leur globalité, ces résultats cliniques semblent cohérents avec les prédictions théoriques et encouragent à continuer d'explorer des irradiations avec

³⁹ En cas d'antécédent de radiothérapie thoracique à visée curative suivie d'une récurrence à distance sur quelques localisations, le fardeau tumoral est généralement bien moindre qu'en cas d'une tumeur métastatique d'emblée ayant reçu uniquement de la chimiothérapie.

objectif de *debulking*, ou de réduction *significative* de la taille tumorale, en maximisant le nombre de cibles, sans se limiter à une ou deux métastases symptomatiques, tout en essayant de maîtriser l'augmentation des effets secondaires.



Par exemple, ce schéma propose le principe d'un essai clinique d'immuno-radiothérapie où les volumes d'irradiation et les thérapies systémiques pourraient être adaptés au risque de progression sous immunothérapie: les patients à bas-risque pourraient ne recevoir que de l'immunothérapie et éventuellement de la radiothérapie en cas de progression de lésions existantes ou de nouvelles lésions, tandis que les patients avec un risque de progression modéré ou élevé recevraient une radiothérapie de debulking visant à une réduction significative du fardeau tumoral (ici, au moins 50%), sans limitation a priori du nombre de cibles à irradier et sans se limiter aux métastases les plus menaçantes ou les plus symptomatiques. Une double immunothérapie, ou une bithérapie par chimio-immunothérapie pourraient même être envisagée pour les patients à risque maximum. La stratification du risque pourrait faire appel à de nombreux paramètres, en particulier le fardeau tumoral global et à l'agressivité tumorale comme défendu dans cette thèse, mais sans exclure *a priori* d'autres méthodes (biomarqueurs, signatures génomiques ou radiomics, etc).

Durée de réponse aux inhibiteurs de checkpoint

Il a été présenté précédemment que tous les répondeurs aux immunothérapies ne sont pas des longs-répondeurs, même si certains patients peuvent répondre pendant des années. Beaucoup de patients rechutent après une réponse relativement courte de quelques mois. Les mécanismes de l'échappement aux immunothérapies après une réponse initiale ne sont pas clairement établis.

A l'intérieur des répondeurs, le modèle décrit un continuum de durée de réponse très variable, dans ce cas particulier selon le degré de synchronisme entre radiothérapie et début de l'inhibiteur de checkpoint (Figure 4-B). Dans ce modèle, une réponse courte à l'immunothérapie suivie d'une rechute n'est pas la résultante d'une inefficacité de l'immunothérapie, mais plutôt d'une inadéquation de la stratégie de potentialisation (dans ce cas particulier, la radiothérapie d'induction est commencée trop tôt avant le début de l'immunothérapie et la synergie est insuffisante).

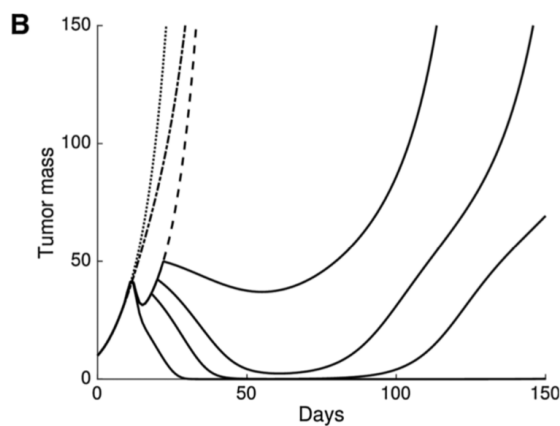


Figure 4B de l'article: décrit comment une réponse initiale puis un échec de l'immuno-radiothérapie peut résulter, ici, d'un délai trop long entre la fin de l'irradiation et le début des inhibiteurs de checkpoint.

Ceci ouvre une discussion sur les stratégies de re-sensibilisation en cas d'échec d'immunothérapie après réponse initiale: plutôt que l'arrêt de l'immunothérapie avec changement de ligne, on pourrait envisager le maintien de l'immunothérapie avec tentative de "re-vaccination" soit par radiothérapie, soit par l'ajout ou le changement de thérapie systémique, ce qui pourrait faire l'objet d'essais cliniques⁴⁰. La multiplicité des piliers de la cancérogenèse pourraient également inciter à tenter de conserver une action pro-immunitaire, même d'efficacité incomplète, et de la compléter par d'autres thérapies, plutôt que d'adopter une approche séquentielle plus facile à contourner, tant que la tolérance l'autorise.

Toxicités

Ce modèle ne cherche à décrire que l'efficacité sans considérer les toxicités, dont l'importance a été présentée dans la présentation de l'immuno-radiothérapie.

⁴⁰ De telles stratégies de re-sensibilisation par debulking en radiothérapie ont été positives avec les CAR-T cells dans certaines hémopathies, comme vu précédemment.

La raison principale est la rareté des données de toxicité disponibles à l'époque où ce modèle a été conçu (2016). Pourrait-on adapter ce modèle pour décrire les toxicités? C'est théoriquement possible: l'équation de la croissance tumorale devrait être supprimée; le tissu cible ne serait plus la tumeur mais un organe à risque, de volume constant. On conserverait le lien entre dose de radiothérapie à l'organe à risque, volume irradié, production d'antigènes tissulaires, réponse immunitaire et éventuellement effet secondaire auto-immun. Ensuite il faudrait calibrer les paramètres du modèle pour décrire au mieux les toxicités observées en clinique (utilisation nécessaire de logiciels pour les modèles non-linéaires à effets mixtes comme MONOLIX ou NONMEM). Un lien dose-effet pourrait alors en être déduit et on pourrait en tirer des limites sur les doses par fraction, les doses totales, les volumes d'organes à risque. Des données de dosimétrie seraient nécessaires: les histogrammes dose-volume devraient donc être des données de calibration.

Ce modèle aura donc tendance à lier naturellement dose, volume et probabilité de toxicité: ces concepts recourent donc ceux de la radiobiologie classique.

Cette approche sera peut-être trop simpliste pour l'immuno-radiothérapie et on peut imaginer qu'elle pourrait être un jour complétée par des biomarqueurs, des radiomics, des signatures génétiques. Mais à moyen terme, les classiques histogrammes dose-volume sont non seulement encore d'actualité mais demeurent, jusqu'à preuve du contraire, le moyen privilégié d'analyse des toxicités.

Modélisation des traitements antiangiogéniques

Dans ce modèle, un antagoniste de la néovascularisation tumorale aurait tendance à ralentir la croissance tumorale. D'un point de vue *phénoménologique*, ceci pourrait être décrit en augmentant le paramètre responsable du taux de nécrose tumorale spontanée, ce qui produirait une plus grande quantité d'antigènes tumoraux et viendrait mécaniquement augmenter le contingent des effecteurs immunitaires et donc l'effet anti-tumoral de l'immunothérapie. Du point de vue mécanistique, cette modélisation pourrait traduire une normalisation partielle de la vascularisation tumorale permettant une meilleure infiltration par le système immunitaire, ainsi qu'une diminution des ressources disponibles pour la croissance de la tumeur, entraînant une diminution de la croissance tumorale.

En résumé, ce modèle simple “tumeur-antigène-immunité” peut également décrire une synergie entre médicaments anti-angiogéniques et immunothérapies.

Effectivement, de telles combinaisons se sont montrées efficaces en clinique et ont été approuvées récemment dans le cancer du rein métastatique: essai positif Axitinib et Pembrolizumab en 2019 (128), puis l’essai Lenvatinib et Pembrolizumab en 2021 (129).

On pourrait ainsi modéliser la triple combinaison radiothérapie, immunothérapie, anti angiogénique, par exemple pour chercher à en réduire la toxicité. Il existe des doutes sur la sécurité de la combinaison de la radiothérapie avec les inhibiteurs multiples de tyrosine kinase (130). Quant au profil de tolérance de l’immuno-radiothérapie, il a été présenté précédemment. La trithérapie pourrait donc poser des problèmes de sécurité, susceptibles d’être adressés par la modélisation.

Modélisation de l’immunogénicité des antigènes tumoraux

Dans ce modèle les antigènes tumoraux sont tous supposés contribuer de manière égale à la stimulation des effecteurs immunitaires. En réalité: seuls certains antigènes sont immunogènes, la plupart ne sont pas reconnus par le système immunitaire. Cependant, si l’on fait l’hypothèse moins forte que seule une minorité d’antigènes tumoraux est immunogène, mais que cette proportion reste sensiblement *constante*, alors ce modèle reste vrai (à une constante multiplicative près), seule la calibration d’un paramètre change.

Cependant, cette hypothèse de stabilité de l’immunogénicité est contestable: selon que la mort cellulaire est obtenue par apoptose ou nécrose, la quantité d’antigènes relarguée varie de manière importante (plus importante en cas de nécrose). Or si la radiothérapie provoque une mort cellulaire par nécrose et apoptose, leurs proportions relatives sont inconnues, et dépendent possiblement de la dose par fraction.

Aussi il conviendrait d’utiliser ce modèle dans des plages de dose par fraction à l’intérieur desquelles la biologie de la radiothérapie reste relativement stable. Par exemple: entre 1.8 et 3 Gy, entre 3 et 6 Gy et au-delà de 6 Gy. Mais une comparaison directe entre une irradiation utilisant des doses supérieures à 6 Gy avec des doses usuelles de 2 Gy par fraction serait sujette à caution.

Une autre remarque concerne l’imprédictibilité de l’immunogénicité des tumeurs. Ainsi la réponse aux immunothérapies en monothérapie est imprévisible au niveau d’un patient et les biomarqueurs prédictifs de réponse aux immunothérapie sont plutôt

décevants (comme l'expression de PD1), même si certains semblent plus fiables (TMB, statut MSI). Aussi, pour qu'un tel modèle de combinaison de traitement soit utilisable, il conviendrait de l'appliquer sur des populations de patients homogènes du point de vue des biomarqueurs prédictifs de réponse.

Modélisation de la mémoire-immunitaire

Dans ce modèle, la réponse immunitaire produit progressivement une réponse de long-terme. Ceci a été modélisé en créant progressivement des effecteurs immunitaires-mémoire (réponse secondaire) à partir des effecteurs de la réponse primaire. Cette hypothèse a certainement des limites, mais elle permet de décrire une relation positive entre l'immunité de long terme et la quantité de stimulation antigénique (comme pour un vaccin avec une dose initiale puis des rappels). La simplicité de la formulation choisie comporte des limites: une très grande quantité d'antigènes tumoraux produite en une seule fois produirait la même réponse immunitaire que plusieurs quantités plus faibles, produites de manière espacée dans le temps. C'est probablement faux mais comme avec tout modèle, la connaissance des hypothèses simplificatrices est indispensable pour une utilisation rationnelle.

La modélisation de la réponse immunitaire de long terme est-elle utile? C'est en fait un sujet actuel: chez les patients long-répondeurs aux immunothérapies, se pose la question de l'arrêt du traitement, en particulier pour des raisons médico-économiques.

Des données empiriques peuvent être obtenues en clinique, puisque ces traitements, sauf échec, sont souvent arrêtés après une période de traitement comprise entre 12 et 24 mois. Il est donc envisageable de collecter des statistiques de récurrence pour alimenter des modèles mathématiques ou statistiques.

L'intérêt de notre modèle est qu'il contient une modélisation du traitement administré (il est - partiellement - mécanistique). Après calibration du modèle sur les données de récurrence, on pourrait donc théoriquement chercher des modifications de traitement censées augmenter la survie sans récurrence à l'arrêt de la maintenance. De telles simulations numériques sont publiées dans l'article (Figure 3).

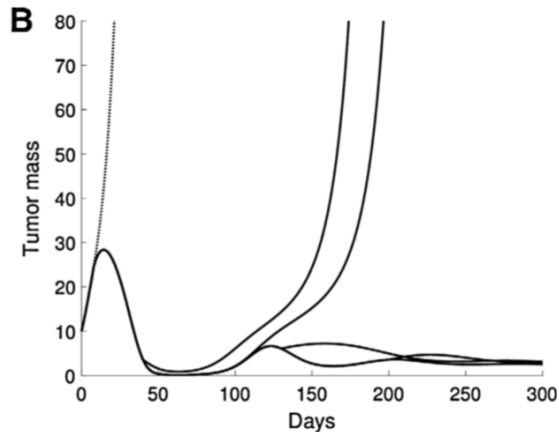


Figure 3B de l'article: illustre comment une durée suffisante d'exposition aux inhibiteurs de checkpoint peut provoquer une stabilisation durable de la masse tumorale, même après arrêt du traitement, tandis qu'une exposition trop courte conduit à une récurrence à l'arrêt.

Bien sûr, étant donné les hypothèses simplificatrices, une grande prudence serait de rigueur et les modifications se devraient d'être incrémentales.

On pourrait par exemple chercher à savoir si un certain nombre de "doses de rappel" de stimulation antigéniques sont protectrices contre la récurrence en cas d'arrêt de l'immunothérapie. Ces "rappels" peuvent prendre la forme d'irradiation de métastases sous immunothérapie. Il serait possible de modéliser numériquement des scénarios et d'explorer *in silico* des stratégies.

Selon la quantité (et la variété) des données cliniques, d'autres approches sont possibles: de simples statistiques peuvent suffire, mais pour définir de nouvelles stratégies jamais tentées en pratique clinique, l'approche *in silico* est mieux appropriée.

Enfin, en dépit d'un grand nombre de patients désormais traités, la durée optimale de maintenance sous immunothérapie n'est toujours pas connue: si dans certains cas la poursuite au-delà de 12 mois diminue les taux de récurrence (CHECKMATE-153), il demeure que de nombreux patients bénéficient d'une protection prolongée après une exposition minimale aux inhibiteurs de checkpoint (131,132). L'utilisation de modèles numériques, mécanistiques ou statistiques, pourrait être une piste pour clarifier quels sont les patients les plus à même de bénéficier d'un prolongement de la maintenance et s'il existe des stratégies d'irradiation pour raccourcir la durée nécessaire d'exposition aux inhibiteurs de checkpoint.

Synchronisation entre checkpoints inhibiteurs et radiothérapie

Dans ce modèle, la relation de causalité directe entre la production d'antigènes tumoraux par l'irradiation et la stimulation de la réponse immunitaire, implique que le maximum d'efficacité doit être obtenu si le patient est irradié au moment où il a déjà atteint (ou est très proche de) son plateau d'exposition à l'inhibiteur de checkpoint. En pratique clinique, ce plateau d'exposition ne sera atteint qu'après plusieurs cycles d'immunothérapie: par exemple, dans le cas du Pembrolizumab, des études pharmacocinétiques montrent que ce délai est supérieur à 6 semaines (133). On pourrait éventuellement envisager l'utilisation de doses de charge d'immunothérapie, afin de raccourcir ce délai.

Effectivement, dans l'essai récent de Ratnayake et al (111), les patients avec la meilleure réponse sont ceux pour lesquels la radiothérapie a été commencée après le 3ème cycle d'immunothérapie, par rapport aux patients ayant débuté la radiothérapie au 1er et 2ème cycles. Ces résultats cliniques postérieurs de plusieurs années à notre modèle mathématique en soulignent la pertinence.

Comme le délai entre irradiation et mort cellulaire pourra être de plusieurs jours, surtout en cas d'irradiation prolongée à de faibles doses par fraction, il est possible qu'une certaine synergie résiduelle existe, même dans des conditions de synchronisation non-optimales où l'immunothérapie est commencée avec du retard.

Des simulations numériques publiées dans l'article (Figures 4-B et 4-C) illustrent l'importance potentielle de la synchronisation avec l'impact du retard entre l'irradiation et le début du traitement par inhibiteur de checkpoint. Dans ces simulations, l'effet de synergie est perdu si l'inhibiteur de checkpoint est débuté plus de 10 jours après l'irradiation. Ce résultat est cohérent avec les expériences animales utilisées pour calibrer le modèle, et argumente l'hypothèse que le mécanisme de cette perte d'efficacité est expliqué par la disponibilité limitée dans le temps des antigènes tumoraux libérés par irradiation.

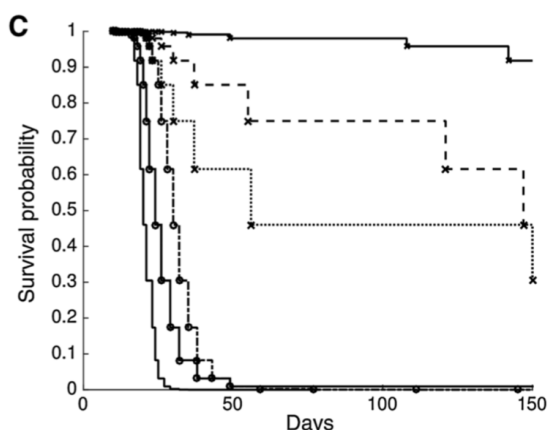


Figure 4C de l'article: courbe de survie expérimentales reproduisant in-silico l'impact du délai entre le début des inhibiteurs de checkpoint et la fin de l'irradiation (délai : 0, 10, 14 jours, avec et sans anti-PD1): au delà de 10 jours la synergie disparaît.

De manière remarquable, dans l'essai PACIFIC (115), quand la randomisation était effectuée moins de 14 jours après la fin de la radiothérapie, les patients semblent avoir bénéficié de l'immunothérapie (**HR 0.42**, IC 0.27-0.67), tandis qu'au delà de ce délai, les résultats sont non statistiquement significatifs (**HR 0.81** IC 0.62-1.06), même s'il existe une tendance au bénéfice de l'ajout de l'immunothérapie. Une "petite" marge de sécurité semble donc exister mais elle ne dépasserait pas une quinzaine de jours de délai, en cohérence avec les simulations numériques. Comme il s'agit d'une analyse rétrospective, on ne peut exclure que des facteurs confondants puissent également avoir joué (comme l'état général des patients, susceptible d'être lié au délai entre la fin de l'irradiation et le début de l'immunothérapie), il convient donc de rester prudent dans ces interprétations.

En résumé, une position intermédiaire devra être trouvée entre le désir de viser un optimum pharmacocinétique, éloigné dans le temps après le début de l'immunothérapie, et la nécessité de traiter le patient avant que la croissance tumorale n'engendre des complications.

Plusieurs essais cliniques en cours testent actuellement la concomitance de l'immunothérapie avec la radiothérapie: PACIFIC 2 (NCT03519971), similaire à PACIFIC mais le Durvalumab est désormais concomitant à la chimio-radiothérapie; RATIONALE001 (NCT03745222), où un nouvel anti PD1 (Tislelizumab) est testé en concomitant, en séquentiel et contre la chimioradiothérapie sur les mêmes patients que dans PACIFIC et PACIFIC 2; NIRVANA-Lung (NCT03774732), plus original, où le

Pembrolizumab sera concomitant à une radiothérapie commencée au deuxième cycle et à une chimiothérapie, chez des patients atteints de cancer du poumon NPC localement avancé ou métastatiques et pour lesquels une irradiation du primitif complète ou partielle est autorisée (selon le principe du *debulking*).

Cet argument de concomitance pourrait s'appliquer aux immunothérapies en général, pas seulement aux inhibiteurs de checkpoint. Dans l'essai L19-IL2, le traitement par interleukin 2 couplée à un anticorps monoclonal commence au maximum 7 jours après la fin de la radiothérapie stéréotaxique (134).

L'avenir dira si les traitements concomitants sont effectivement plus efficaces mais aussi suffisamment tolérables. L'expérience des radio chimiothérapies dans le cancer du poumon montre que peuvent coexister sur le long terme des approches séquentielles (moins efficaces) et des approches concomitantes (théoriquement optimales mais au profil de sécurité plus problématique). La sélection des patients pourrait être plus délicate avec les immunothérapies qu'avec la chimiothérapie, en l'absence de biomarqueurs validés.

Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy

Raphael Serre¹, Sebastien Benzekry², Laetitia Padovani³, Christophe Meille⁴, Nicolas André^{1,5,6}, Joseph Ciccolini¹, Fabrice Barlesi^{1,7}, Xavier Muracciole³, and Dominique Barbolosi¹

Abstract

Combining radiotherapy with immune checkpoint blockade may offer considerable therapeutic impact if the immunosuppressive nature of the tumor microenvironment (TME) can be relieved. In this study, we used mathematical models, which can illustrate the potential synergism between immune checkpoint inhibitors and radiotherapy. A discrete-time pharmacodynamic model of the combination of radiotherapy with inhibitors of the PD1–PDL1 axis and/or the CTLA4 pathway is described. This mathematical framework describes how a growing tumor first elicits and then inhibits an antitumor immune response. This antitumor immune response is described by a primary and a secondary (or memory) response. The primary immune response appears first and is inhibited by the PD1–PDL1 axis, whereas the secondary immune response happens next and is inhibited by the CTLA4 pathway. The effects of irradiation are described by a modified version of the linear–

quadratic model. This modeling offers an explanation for the reported biphasic relationship between the size of a tumor and its immunogenicity, as measured by the abscopal effect (an off-target immune response). Furthermore, it explains why discontinuing immunotherapy may result in either tumor recurrence or a durably sustained response. Finally, it describes how synchronizing immunotherapy and radiotherapy can produce synergies. The ability of the model to forecast pharmacodynamic endpoints was validated retrospectively by checking that it could describe data from experimental studies, which investigated the combination of radiotherapy with immune checkpoint inhibitors. In summary, a model such as this could be further used as a simulation tool to facilitate decision making about optimal scheduling of immunotherapy with radiotherapy and perhaps other types of anticancer therapies. *Cancer Res*; 76(17); 4931–40. ©2016 AACR.

Major Findings

To help the design and efficacy analysis of combined anticancer therapies, this article proposes a set of mathematical equations that describe the pharmacodynamics of radiotherapy in combination with two paradigmatic immunotherapies, namely the blockers of the PD1–PDL1 axis and of the CTLA4 pathway. These equations explain several experimental results reported in preclinical and clinical settings. Together with published pharmacokinetic models, they pave the way for the efficient *in silico* design and optimization of combined anticancer therapies mixing immunotherapy and radiotherapy; this approach is currently under active investigation because of its strong potential synergism.

Introduction

Immune checkpoint inhibitors are considered as a major advance in a variety of cancer diseases with dismal prognosis (1). Despite outstanding progress in melanoma and lung cancers, a majority of patients will nevertheless fail in achieving long-lasting responses. Associating radiotherapy with immunotherapy has shown synergistic effect and is now considered as a promising strategy to stretch both response and survival at bedside (2). However, combining radiotherapy and immunotherapy can be done following a variety of different modalities. Determining the exact scheduling of the radioimmunotherapy association is therefore critical, and standard empirical approaches (trial-and-error) will hardly meet the current requirements of fast-track approvals of novel therapies. In this respect, developing modeling and simulation tools able to describe biological and pharmacodynamics processes should

¹Aix Marseille University, SMARTc Unit, Inserm S 911 CRO2, Marseille, France. ²MONC team, Inria Bordeaux Sud-Ouest, Institut de Mathématiques de Bordeaux, Talence, France. ³Department of Radiotherapy Oncology, CHU La Timone, Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille, France. ⁴Novartis Pharma, Basel, Switzerland. ⁵Department of Pediatric Hematology and Oncology, CHU La Timone, Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille, France. ⁶Centre d'Essais Précoces Cancérologie Marseille (CEPCM), CHU La Timone, Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille, France. ⁷Multidisciplinary Oncology & Therapeutic Innovations Unit, Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Dominique Barbolosi, Aix-Marseille Université, UMR_S 911 INSERM, Faculté de Médecine et Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean MOULIN, Marseille cedex 05, 13385 France. Phone: 336-6253-7759; Fax: 334-9183-5667; E-mail: dominique.barbolosi@univ-amu.fr; and X. Muracciole, xavier.muracciole@ap-hm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3567

©2016 American Association for Cancer Research.

Serre et al.

Quick Guide to Equations and Assumptions

As a general modeling principle, no attempt was made to include all the currently available knowledge on immunology and radiotherapy. Trying to build a biologically exhaustive model would have resulted in an unnecessary complex mathematical framework of reduced practical interest. Instead, a limited number of biological hypotheses have been considered to derive a reduced set of equations. As a consequence, the model uses only a small number of parameters although sufficient to describe the experimental results of interest.

Biological hypotheses and mathematical interpretations

The following simplifying assumptions have been made:

- About the immune escape mechanism, we assumed that the growth of the tumor mass induces a progressive state of immune tolerance; this process has been reported in the 1970s by several authors and later attributed to a number of biological processes such as immune cell exhaustion, the activation, and accumulation of inhibitory immune cells such as Tregs, MDSCs, and M2-type tumor-infiltrating macrophages (8–11); other interesting contributing factors to immune escape, such as the selection of poorly immunogenic variants, have not been modeled because their additional explanatory power has been estimated relatively modest in comparison with their mathematical complexity;
- As a consequence of the immune escape mechanism, the activity of the immune response is a non-monotonic (or biphasic) function of the tumor mass; it increases with tumor mass as long as the volume remains below a certain threshold, then it decreases; this is coherent with results in refs. 9–11, 28–32. The coupling between the tumor dynamics and the immune response is obtained mathematically by the product of two mechanisms. In the first mechanism, the tumor produces antigens that stimulate the immune response in a tumor size-dependent manner; this explains the increasing part of the immune response curve as a function of tumor size. The second mechanism is a tumor size-dependent neutralization of the immune response, which produces the decreasing part of the immune response curve after the tumor-size has reached a critical threshold, where the effect of immune neutralization exceeds the effect of immune stimulation;
- The nonimmunologic effects of radiotherapy have been described by a linear-quadratic model (5–7), which we have modified to describe more finely the tumor mass dynamics after irradiation;
- On the stimulation of the immune response by irradiation, the different explanations given by several authors (15, 33–37), even though they differ by their biological nature, have been assumed to produce additive effects that can be approximately described by a unique equation, which involves the release of tumor antigens by radiotherapy;
- The downregulation of the immune response by irradiation is modeled by two mechanisms. First, radiotherapy may kill the immune effectors in the irradiation field. This is a mathematical interpretation of preclinical data published in ref. 37. Second, the immune effectors downregulate the immune response; because effectors are in relation with tumor antigens, and therefore the radiation dose, this creates a dose-dependent immune downregulation, in coherence with the preclinical data published in ref. 22, involving the PD1–PD-L1 axis, or with other biological models involving the TGF β signaling pathway (20, 21);
- Because the blockade of the PD1–PD-L1 axis promotes the antitumor activity of the T-cell response by reducing the expansion of tumor-infiltrating MDSC and T regulatory lymphocytes (1), we made the anti-PD1 mAb serum concentration an inhibitor of the immune response downregulation;
- Because the immune response in anti-CTLA4 mAbs treatment is thought to be mostly caused by an increased activity of CD4⁺ T cells and the subsequent stimulation of the secondary (or memory) immune response (1), we made the anti-CTLA4 mAb concentration a stimulating factor of the memory response and we neglected its direct contribution to the primary immune response (even though CTLA4 blockade does also have a modest effect on the primary immune response, which is caused by the increased inhibition that CTLA4 blockade exerts on the growth of the tumor mass; this smaller tumor mass reduces the inhibition of the primary immune response by the tumor mass according to Eq. D). Hence, our mathematical formulation of the immune response has been separated into two additive components: the primary immune response and the secondary (or memory) immune response, each part corresponding to its eponymous biological counterpart; the secondary response is assumed to appear progressively after the primary response, as a result of the cumulative effect of the primary response. The secondary response appears relatively slowly but has a long-lasting effect and it is not sensitive to tumor downregulation, contrary to the primary response. This is our mathematical interpretation of immunologic processes for which one can find a comprehensive review in ref. 1;

From these biological hypotheses, we derived the set of equations presented in the next section.

Mathematical model of radiation and immunology

The model is described by 5 discrete-time equations:

$$T_{n+1} = S_n(\mathbf{d}) \cdot T_n \cdot e^{(\mu - Z_{\text{qem},n} - Z_{\text{acc},n})} \quad (\text{A})$$

$$A_{n+1} = (1 - \lambda) \cdot A_n + \rho \cdot T_n + \psi \cdot (1 - S_n(\mathbf{d})) \cdot T_n \quad (\text{B})$$

$$L_{n+1} = (1 - \phi) \cdot \delta_n \cdot L_n + \lambda \cdot A_n \quad (C)$$

$$Z_{prm,n} = \frac{\omega \cdot L_n}{1 + \frac{\kappa \cdot T_n^{1/3} \cdot I_n}{1 + p_1}} \quad (D)$$

$$Z_{sec,n} = \sum_{k=0}^n \gamma \cdot \frac{1 + c_4}{r + c_4} \cdot Z_{prm,k} \quad (E)$$

Here, these equations describe the changes over a one-day period, between day n and day $n + 1$, though any time step could be chosen. A visual representation of the links between the variables is provided in Fig. 1, while the detailed explanations are provided in the next section.

help to better determine an optimal solution among numerous possibilities.

Radiotherapy is widely used in the treatment of primary and metastatic tumors. The biological effects of radiation on tumors

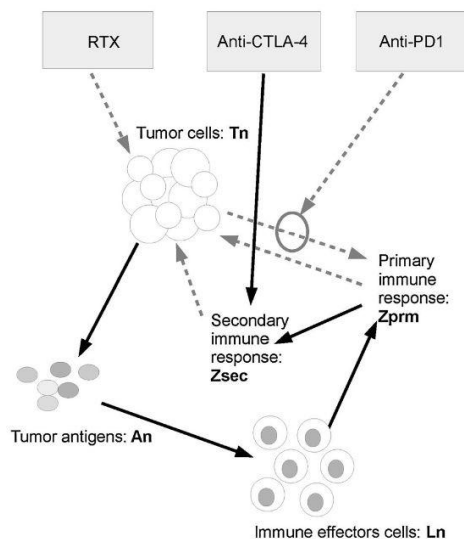


Figure 1. Schematic representation of the relations between the components of the proposed mathematical model. Tumor antigens (An) are produced either naturally by the tumor cells (Tn) or by the radiation cell kill. They induce the production of immune effector cells (Ln) that exert a cytotoxic effect on the tumor cells via an immunologic attack that is composed of a primary and a secondary response. The primary response can be downregulated by the tumor via the production of PD-L1, and this tumor inhibition can be mitigated by inhibitors of the PD1-PDL1 axis. The secondary response cannot be downregulated by the tumor and has a long-lasting effect. The secondary response is dependent on the intensity and duration of the primary response and can be potentiated by inhibitors of the CTLA4 pathway. Arrows with a solid line symbolize a relation of stimulation, whereas arrows with a dotted line symbolize a relation of inhibition.

include DNA damage, modulation of signal transduction and alteration of the inflammatory tumor microenvironment (TME). The induction of irreparable DNA damage and cell-cycle arrest can induce lethal mechanisms, including mitotic catastrophe, apoptosis, necrosis, autophagy, and senescence (3). Traditionally, the DNA damages and the subsequent tumor cell kill have been explained with the classical 4 R's of radiobiology: repopulation, reoxygenation, repair of sublethal damage, and redistribution within the cell cycle (4). These mechanisms have long been described by widely used radiotherapy models such as the linear-quadratic (5–7).

Cancer immunotherapy aims at stimulating the ability of the host immune system to eliminate tumor cells through the recruitment and activation of cytotoxic effector cells. A close relationship exists between the tumor cells, the innate and the adaptive immune cells (8); this interplay may be explained by the theory of immunosurveillance or the 3 E's: elimination, equilibrium, and tumor escape. The cancer cells are first eliminated by an innate immune response involving natural killer cells, then by a specific immune response provoked by antigen-specific cytotoxic T cells. But the strength of the immune response gradually decreases during the equilibrium phase, as a result of several distinct and nonexclusive mechanisms, which eventually help the tumor to escape the immune system. Even though these complex biological mechanisms could not be known at the time, the gradual loss of tumor immunogenicity had been established in the 1970s by pioneering studies on the link between the size of a tumor and its ability to induce an immune response (9–11).

This escape mechanism could be, at least partly, reversible: several preclinical and clinical studies have reported the ability of radiation to activate the immune system, to enhance the immune response and to contribute to the control of cancer (12–15). The CD8⁺ T lymphocytes play a major role in antitumor immunity, hence radiotherapy requires their presence for postirradiation tumor control (16) and their activity is stimulated by irradiation (17). Wattenberg and colleagues (18) reported on several cases where radiation sensitizes the tumor cells to immune-mediated killing, through a process called immunomodulation (18, 19). Importantly, they showed that the increase in the strength of the immune response was dose related.

Furthermore, the effect of radiation on the immune response may not be only one way: radiotherapy may also induce immunosuppressive effects by increasing the tumor cell expression of

Serre et al.

PD-L1, the secretion of TGF β , the expansion of CD4⁺ T regulatory (Treg) cells, of myeloid-derived suppressor cells (MDSC), the maturation of type M2 macrophages (20, 21), and the death of the immune effectors located in the irradiation field (22, 23). Hence, the effects of irradiation could involve a balance between immunostimulation and immunosuppression.

Enhancing the antitumor immune response has long been a field of intensive research. As of today, the most promising drugs having reached clinical approval belong to two types of immune checkpoint inhibitors. They consist in two families of mAbs: the first one (such as ipilimumab) targets the cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4); the second one (such as nivolumab, pembrolizumab, and lambrolizumab) targets the programmed cell death 1 (anti-PD1) or its ligand (anti-PDL1). Preclinical studies have provided evidence of the synergistic effect between radiation, anti-CTLA-4 mAbs and/or anti PD-1 or PD-L1 mAbs in different *in vivo* models (12, 22, 24).

The abscopal effect of radiotherapy is defined as a regression of tumor or metastases in a site outside the field of irradiation, occurring at a distance that the effect cannot be explained by direct or scattered radiation; it is immune-mediated and probably caused by the release of danger signals that activate CD8⁺ cytotoxic T cells, which participate in the control of the nonirradiated residual tumor and metastases (15). The abscopal effect of radiation in combination with ipilimumab was reported in different case reports (14, 25–27). These data from preclinical and clinical studies have confirmed the concept that radiotherapy could lead to the conversion of the tumor into an *in situ* vaccine.

This diversity of medical options paves the way to multimodal anticancer therapies that could unleash synergies between the different modalities. However, the determination of the most beneficial combination of immune therapies with radiation, in terms of doses, scheduling and synchronism for each modality, is crucial to the induction and persistence of a local and systemic antitumor immunity. To find such an optimal combination, a trial-and-error process would require too much effort and would most probably yield to the suboptimal selection of the best performing strategy among a very small set of candidates.

Herein, a mathematical model is proposed to help in the search of such a combined treatment. It contains a simplified model of tumor growth coupled with antitumor immune response. These equations correctly describe several experimental results about the relationship between the immunogenicity of a tumor and its mass dynamics. In particular, this framework explains how the tumor immunogenicity initially increases with its mass, but later vanishes as the TME becomes progressively more immunosuppressive. Then, by deriving a modified version of the linear-quadratic model, the effect of irradiation on the antitumor immune response are simply modeled by the release of tumor antigens out of irradiated tumor cells. Finally, pharmacodynamic equations are derived to describe the effects of the two families of immune checkpoints inhibitors (targeting either the PD1–PD-L1 axis or the CTLA4 pathway). These equations explain the experimental synergies between irradiation and immune checkpoint inhibitors that have been reported by several authors. Because this model is capable of describing a variety of experimental results, it could probably be used as a tool to simulate multimodal anticancer therapies and also help in the selection of the most efficient ones.

Materials and Methods

Tumor dynamics

The compartment T_n is the tumor mass on day n , expressed in grams. The parameter $\mu > 0$ is constant and expresses a constant exponential growth. Hence, over a one-day period, in the absence of treatment and assuming no activity of the immune system, the tumor mass is multiplied by $\exp(\mu)$. This simplification is adequate to describe the experimental results presented here, involving small-size murine tumors, even though other tumor mass dynamics could be used, such as the Gompertz growth model for example, because the cell loss factor is probably volume dependent in human tumors as explained in refs. 38 and 39.

The immune system is the only antitumor agent explicitly considered: Depending on its intensity, it can merely slow down tumor growth or can provoke a shrinkage of the tumor mass and eventually eradicate it. The tipping point between these two behaviors is $Z_{\text{prim},n} + Z_{\text{sec},n} = \mu$. If $Z_{\text{prim},n} + Z_{\text{sec},n} < \mu$ the immune system slows down tumor growth, if $Z_{\text{prim},n} + Z_{\text{sec},n} > \mu$ the immune system makes the tumor mass shrink.

The constant μ implicitly includes other cell loss factors such as, for example, the necrosis of tumor cells resulting from inadequate vascularization and the resulting lack of nutrients or oxygen. Hence, μ could be made a dynamic parameter in a more complex model involving, for example, tumor angiogenesis.

The quantity $S_n(d)$ denotes the survival probability at time n for a cumulative radiation dosing regimen $d = (d_1, \dots, d_n)$, where d_i is the radiation dose received on day i (d_i being possibly zero). Its expression is derived from our modified formulation of the linear-quadratic model (see the Supplementary Material section for explicit mathematical derivation and expression).

The meaning of the primary and secondary components of the immune system (the terms $Z_{\text{prim},n}$ and $Z_{\text{sec},n}$, respectively) is detailed in Eqs. D and E.

Antigen dynamics

The compartment A_n models the amount of tumor antigens. Antigens are released either naturally by tumor cells at a constant rate ρ or after irradiation at a rate $\psi \cdot [1 - S_n(d)]$, where $S_n(d)$ is the radiation survival probability as defined previously. The constant rate ρ controls the intrinsic (nonradiation-induced) immunogenicity of the tumor, while the constant ψ controls the radiation-induced immunogenicity. The constant parameter $\lambda \in [0, 1]$ controls the rate at which these antigens disappear from the system and produce immune effector cells L_n .

Note that despite the use of the word antigen, the proposed model is actually agnostic about the precise biological mechanism by which radiation stimulates an immune response: As long as this stimulation is approximately proportional to the number of cells killed, the model holds and the compartment A_n may describe a time delay between irradiation and immune stimulation.

Lymphocytes (or immune effectors) dynamics

The compartment L_n models the immune effectors at the tumor site: tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), tumor-associated macrophages (TAM), etc. This compartment is fed at a constant rate $\lambda > 0$ from the compartment of the tumor antigens A_n , that are either produced naturally or released by irradiation. Immune effectors exit the system at a constant rate $\varphi > 0$.

The immune cells that are located in the tumor when radiation is administered are killed and this is modeled by the survival

probability δ_n , for which we might have used a linear-quadratic model. However, for simplicity we have assumed that no immune effector in the tumor survives the doses used in clinical practice, hence: $\delta_n = 0$ if radiation is applied at day n on the tumor, $\delta_n = 1$ otherwise.

Primary immune response

The variable $Z_{\text{prim},n}$ models the primary activity of the immune system. As its name indicates, it is our mathematical formulation of the biological concept of primary immune response to the tumor, that is, it is biologically composed of an innate and of an adaptive immune response (but this breakdown is not reflected in this model).

According to our model, the primary immune response is proportional (with the constant ω) to the number of immune effectors L_n multiplied by the ratio of immune effectors that are active against the tumor, defined as $1/[1 + (\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n)/(1 + p_1)]$:

The constant κ models the intrinsic ability of the tumor to downregulate the immune system. For example, it could contain the propensity of the tumor to express immunomodulatory proteins along with the propensity of immune cells to express receptors for these factors, such as PD-L1 and PD1, respectively. *Ceteris paribus*, the higher the tumor volume, the higher the amount of immunomodulatory factors produced by the tumor, hence the term $T_n^{2/3}$. The power $2/3$ is used because it provided a good fit of experimental data on tumor immunogenicity; it links the amount of immunomodulatory factors to the surface of the tumor rather than its volume, which makes sense if one considers that the center of a tumor may contain necrosis and should be less infiltrated by the immune effectors. *Ceteris paribus* again, the higher the number of immune effectors infiltrated in the tumor site, the higher the amount of immunomodulatory factors produced by the tumor cells as a result of increased interactions with the immune system, hence the term L_n . *In fine*, the term $\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n$ can be thought as an amount of immunomodulatory factors produced by the tumor (or by the immune effectors themselves), in response to the attack by the immune effectors, multiplied by a factor that models the affinity for their receptors.

The variable p_1 is the concentration of an anti-PD1 or an anti-PD-L1 immunotherapy drug, it depends from the dosing regimen and pharmacokinetics, which precise description is out of the scope of this article.

A more detailed explanation of the mathematical formulation is provided in the Supplementary Material, along with a discussion about the concurrent blockade of PD1 and PD-L1, and of the consequences of the existence of several concurrent ligands such as PD-L1 and PD-L2.

Secondary (or memory) immune response

The variable $Z_{\text{sec},n}$ models the secondary activity of the immune system, that is, it corresponds to the biological concept of the memory response after a first encounter with a pathogen. The mechanism by which an anticancer secondary (or memory) immune response establishes itself following a primary immune response is complex and not fully understood. However, we used a small number of probable facts to base our mathematical formulation. For a comprehensive review of these mechanisms, the reader is referred to ref. 1.

The secondary response is probably mediated by auxiliary or helper T cells, or CD4⁺ T cells. The secondary response is conditional to the existence of a primary response and is a progressive

process that takes time to complete. Once it is established, the secondary response is long-lasting and relatively insensitive to downregulation by the PD1–PD-L1 axis. Because the inhibitory receptor CTLA4 is expressed mostly on CD4⁺ T cells, we decided that the effect of CTLA-4 blockade would be to inhibit solely the secondary immune response (even though this is probably a simplification). Then, we assumed that for each time step, a constant proportion γ of the activated (or non-exhausted) effectors of the primary immune response will incrementally contribute to the secondary immune response. To secure the long-lasting memory effect, we further assumed that the intensity of the secondary response could not decrease, hence we did not use a clearance rate.

Hence, the secondary immune response follows the primary response, and its intensity is related to the cumulative effect of the primary response. Mathematically we defined the secondary response as the integral of the primary response over time; this integral is simplified into a discrete sum because of the discrete-time formalism.

The variable γ is the propensity of the primary response to induce a secondary response per time-step. Biologically, this propensity could be related, among other things, to the number of CD4 lymphocytes (excluding the regulatory ones).

The variable c_4 is the concentration of an anti-CTLA4 immunotherapy drug, it depends from the dosing regimen and pharmacokinetics, that are out of the scope of this article.

The constant r is chosen greater than 1. Hence, in the absence of the anti-CTLA4 drug, the propensity to induce a secondary immune response per time step is $\gamma/r < \gamma$. If an anti-CTLA4 drug is given, this propensity tends to γ by inferior values.

The Supplementary Material contains more details on the mathematical formulation of the effect of the anti-CTLA4 agent on the secondary immune response.

Results

Abscopal effects and probability of metastatic rejection

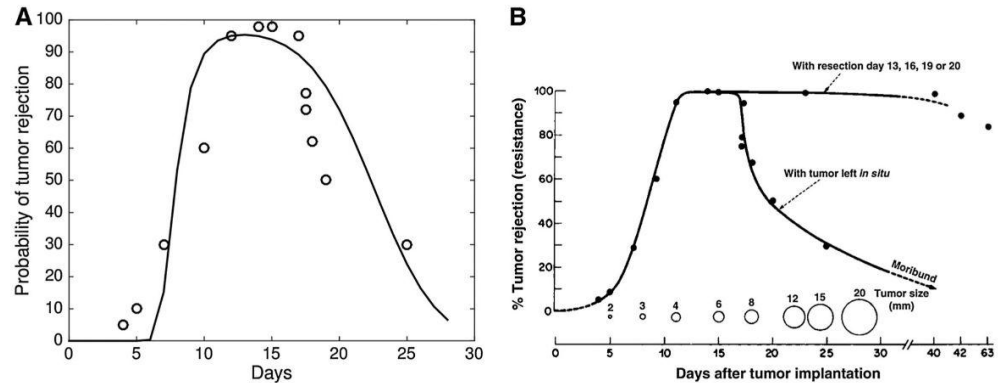
Abscopal effects have been investigated for decades and there are numerous experimental data to choose from. We studied the results in ref. 9 because they provide very detailed data on the link between a tumor size and its propensity to induce an immune response.

After tumor implantation in mice, the author has quantified experimentally the development and decline of immune resistance (or abscopal effect) under the influence of the progressively growing tumor. Within the context of our model, we could replicate his findings and we correctly explain that, as the tumor grows, the percentage of tumor rejection initially increases, then reaches a plateau, ultimately followed by a rapid decline. As shown in Fig. 2, despite the simplifying assumptions of the proposed model, the theoretical tumor rejection probabilities are relatively close to the experimental data for a wide range of tumor volumes; hence, the proposed model was able to describe correctly the immunogenicity of a tumor as a function of its size. The reader is referred to the Supplementary Material section for more details on the mathematical approach that we used to derive a probability of tumor rejection from our dynamic model.

Maintenance of a sustained response after treatment discontinuation

Special case: no secondary immune response. This case applies to a patient whose immune system has been so deeply depleted by

Serre et al.

**Figure 2.**

Abscopal effects and probability of metastatic rejection. **A**, application of the model to describe the probability of metastasis rejection as a function of the number of days after tumor implantation. Circle dots represent percentage of rejection as published in ref. 9, showing the development and decline of immune resistance to tumor challenge under the influence of a progressively growing subcutaneous fibrosarcoma. Solid line represents percentage of rejection as per the model. **B**, original experimental data as published in ref. 9. We have fitted the data of percentage tumor rejection for a primary tumor left *in situ* (bottom curve).

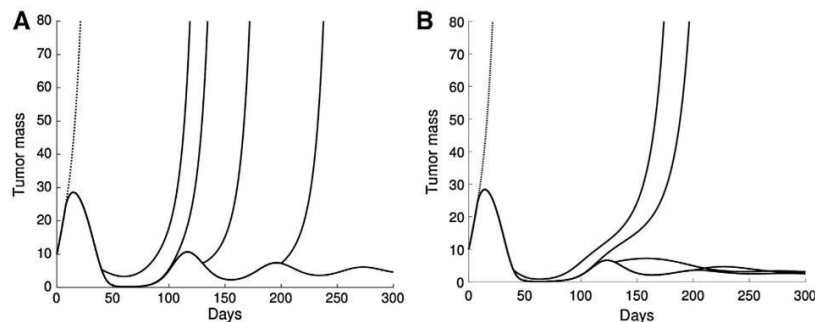
disease or by chemotherapy that the remaining count of $CD4^{+}T$ cell is too low to generate any significant secondary immune response. For results on the depth and duration of $CD4$ lymphopenia induced by chemotherapy, see for example ref. 40. It is also well known by clinicians that the disease itself, even before chemotherapy, may cause a marked lymphopenia. In that case, Eq. E can be entirely removed since $Z_{sec,n} \approx 0$.

In this special case, tumor control cannot be maintained after treatment discontinuation and recurrence is highly expected (see Fig. 3B). According to our model, disease control for this type of patient requires theoretically a perpetual blockade of the PD1–PDL1 axis. We will see that this is not the case if a secondary immune response can be stimulated by the primary response. In

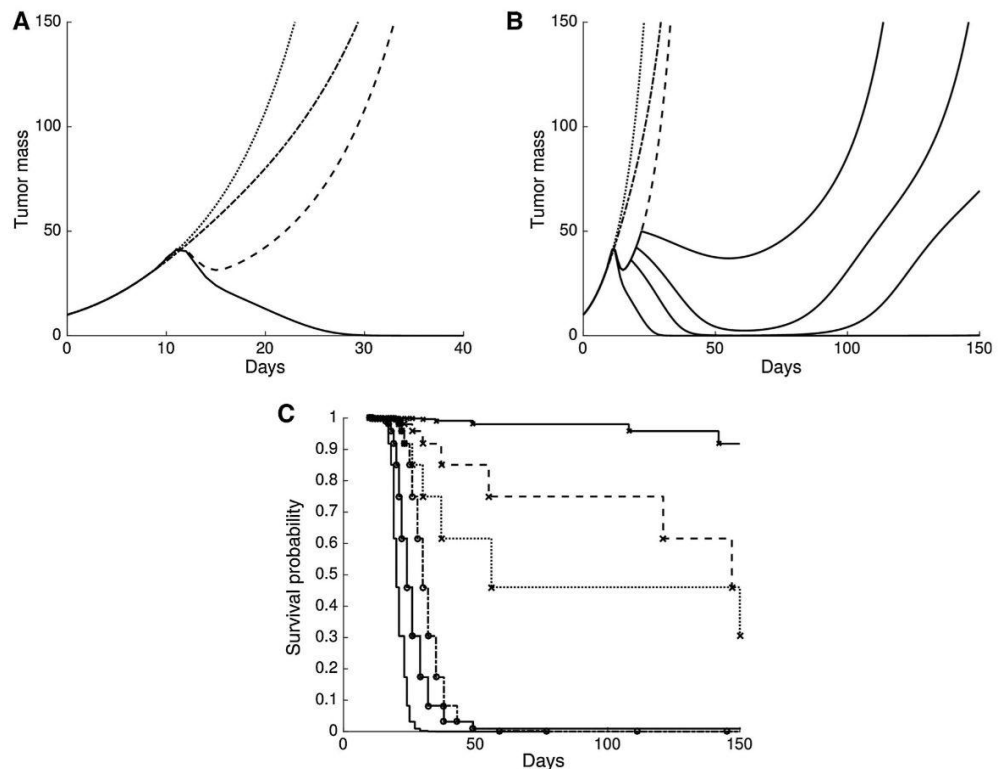
clinical practice, it is reasonable to assume that at least some residual level of secondary immune response persists, which motivates the more general model in the next section.

General case: primary and secondary immune responses. In the general case, disease recurrence may or may not occur after treatment discontinuation depending on its duration and the propensity to induce a secondary immune response (see Fig. 4).

In the proposed model, the concurrent blockade of CTLA4 accelerates the appearance of a long-lasting secondary response. The long-term persistence of the immune response after treatment discontinuation has been noted in several clinical trials of the blockade of the PD1–PDL1 axis, see for example ref. 41.

**Figure 3.**

PD1/PDL1 blockade in monotherapy. Simulated tumor mass with PD1–PDL1 blockade in monotherapy, starting on day 10 and ending on various points in time: day 40, 60, 130, 200, and 300 (solid lines); dotted line, no treatment. **A**, if no secondary (memory) immune response exists, disease recurrence occurs after treatment discontinuation, in all cases. **B**, with a secondary (memory) immune response, disease recurrence does not occur if the treatment has been maintained for 130 days or more. If immunotherapy is maintained indefinitely, the tumor volume tends towards an equilibrium value and slowly oscillates with waves of decreasing amplitudes.

**Figure 4.**

Radiotherapy and PD1/PDL1 blockade. **A**, simulated PD1/PDL1 axis blockade combined with radiotherapy (RT). Radiotherapy, 8 Gy administered as one unique dose on day 10. Immunotherapy was started on the same day and the drug serum concentration was assumed constant from day 10 to the end of the simulation; dotted line, no treatment; dash-dot, PD-L1 blockade; dashed line, radiotherapy; solid line, RT+ α -PD-L1; the mathematical model was able to describe the synergy between immunotherapy and radiotherapy as reported by several authors in preclinical animal models (12, 22). **B**, simulation example, same setup as left except that PD1/PDL1 blockade was started either on the day of irradiation or +10, +12, and +14 days after irradiation; in this numerical example, disease recurrence occurs if immunotherapy is started 10 days or more after irradiation; similar results have been reported with animal models (22) and this shows that our mathematical model correctly describes the impact of synchronization between radiotherapy and the blockade of the PD1/PDL1 axis. **C**, simulated Kaplan-Meier survival curves of the above examples; solid line, no treatment; solid line and circle marks, α -PD-L1; dotted line and circle marks, radiotherapy; double dots and cross marks, RT+ α -PD-L1 starting 14 days after radiotherapy; large dots and cross marks, RT+ α -PD-L1 starting 10 days after radiotherapy; solid line and cross marks, RT+ α -PD-L1 starting on the same day. Details on the production of the Kaplan-Meier curves are provided in the text.

Synergy of radiotherapy and immunotherapy

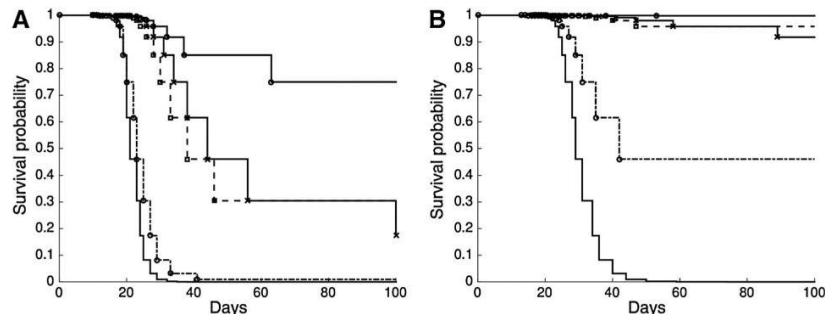
Radiotherapy and PD-L1 blockade. Our model explains the synergistic effects of immunotherapy in combination with radiotherapy. In Fig. 4, we provide a numerical example inspired from various recent publications, such as ref. 12 or 22; this result shows that the model explains why combined treatment can result in sustained remission, whereas radiotherapy or immunotherapy alone only provide a temporary relief followed by recurrence.

Synchronization of radiotherapy and PD1-PDL1 blockade. As shown experimentally in ref. 22, the model predicts that radiotherapy and PD1 or PD-L1 blockade should have sufficient synchronization for a significant synergistic effect to exist. In the proposed model, the

rationale for synchronization relies on the finite quantity of tumor antigens released by irradiation, and the finite lifetime of immune effectors. As time after radiation passes, the quantity of antigens and the immune effectors both decrease and after a while, this reduces the efficacy of immunotherapy that does not produce a substantial synergistic effect (Fig. 4). However, in clinical practice, the concomitant administration of several treatments may result in increased toxicity and adverse events; therefore, more analysis is necessary to derive optimized dosing schedules that are both efficient and have an acceptable tolerability profile.

Radiotherapy and concurrent PD1 and CTLA4 blockades. Results published recently in ref. 14 provide many experimental data

Serre et al.

**Figure 5.**

Radiotherapy and concurrent PD1/PDL1 and CTLA4 blockades. Simulated Kaplan-Meier survival curves of blockade of PD1/PDL1 axis and/or CTLA4 with or without radiotherapy (RT), inspired from the experimental results reported in ref. 14; solid line and circle marks, RT+ α -PD-L1+ α -CTLA4; solid line and cross mark, RT+ α -PD-L1; dotted line and square mark, RT+ α -CTLA4; dash-dot line and circle mark, α -PD-L1+ α -CTLA4; solid line, no treatment; unique radiation dose on day 10, immunotherapies started on day 10, and drug serum concentrations assumed to be constant from that day on. **A**, the mathematical tumor model was adjusted to yield similar long-term survival rates than those reported in ref. 14, while the long-term survival rate of the tri-therapy RT+ α -PD-L1+ α -CTLA4 was about 80%, there was <5% long-term survival if irradiation was not used, even with a dual immune blockade α -PD-L1+ α -CTLA4, as reported in ref. 14. **B**, simulated Kaplan-Meier survival curves using a less aggressive tumor, keeping the other parameters identical [$E(\mu) = 0.108$ in B vs. $E(\mu) = 0.135$ in A, where $E(X)$ stands for the expectation of the random variable X] with this smaller tumor growth rate, the long-term survival rate of the dual immune blockade α -PD-L1+ α -CTLA4 was increased to approximately 50%; however, the model predicts that RT+ α -PD-L1 and RT+ α -CTLA4 should significantly overperform the dual blockade with a long-term survival rate >80%. Numerical parameters are given in the Supplementary Material.

on radiotherapy with the concurrent blockades of the PD1-PDL1 axis and/or the CTLA4 pathway. These works explore the abscopal immune effect of radiotherapy if only a fraction of the total tumor burden is irradiated, and how this immune effect may be magnified by blockades of checkpoint inhibitors. A numerical example directly inspired from their results is provided (Fig. 5, left), along with a theoretical simulation with a less aggressive tumor (with a longer doubling time, all other parameters being identical: Fig. 5, right).

The model was able to produce survival curves similar to those produced experimentally by these authors, hence showing that it is capable of modeling the synergy between radiotherapy and PD1/PDL1 or CTLA4 blockades. The simulated example with the (theoretically) less aggressive tumor shows how the model can be used to compare different modalities while assuming various hypotheses about the underlying tumor.

The Kaplan-Meier survival curves have been produced numerically by assuming (i) that the death automatically results from the tumor mass exceeding a fixed threshold (set to 10 times the mass on day 1), and (ii) that the tumor growth rate is a random variable with a log-normal probability density function [whose SD has been set such that 95% of the tumors have a growth rate μ within (80%–120%) of the peak value]. Despite these simplifications, the model adequately describes the experimental survival curves. The possibility to simulate mathematically the Kaplan-Meier curves is both practical and intuitive for most clinicians.

Discussion

For decades, improving cancer therapy has been achieved by trial-and-error practices. Most phase III registration studies or multicentric clinical trials calling for a change in practice have been designed on empirical basis. In some cases, such empirical designs have led to approving new drugs with suboptimal dosing

(for instance, sunitinib as a single agent has been a major breakthrough for treating renal carcinoma, but it took years of bedside practice to learn that the official dosing was probably not the optimal one; ref. 42). Defining optimal modalities of treatment turns to be even more complicated when several strategies or multitherapies are to be combined. Today, the ever-growing complexity of cancer biology and the plethora of new agents being regularly approved makes determination of optimal dosing and scheduling a challenging task that cannot be addressed anymore by empirical approaches. Consequently, developing computational-aided strategies to better design combined therapies is attractive, because *in silico* simulation can help to test numerous modalities in a time and cost-effective fashion.

The recent achievements in the field of cancer immunotherapy have been recognized as a major breakthrough. However, despite very encouraging results, improvements of the response rates and survival are still needed because many patients will fail in maintaining sustained clinical benefit. In this respect, association of immune checkpoint inhibitors with other strategies (e.g., chemotherapy, radiotherapy) is a promising perspective, as the most striking past improvements in cancer therapy have been achieved thanks to the combination of a variety of strategies. Indeed, it is widely acknowledged now that beating cancer will not come from a single miraculous agent, but rather from the rational combination of a number of complementary strategies that could be chosen from various types of immunotherapy, radiotherapy protocols, antiangiogenic agents, targeted therapies, and different chemotherapy regimen. Ideally the dosing, duration, and relative scheduling of the different components should be optimized by taking into account the potential synergies as well as the possible antagonisms and toxicities. Given the countless possibilities of combinational therapy and the critical challenge of picturing all the interactions between complex and intricate pharmacologic processes, we believe that an integrated mathematical model

could be of great help to optimize these combinations *in silico* prior to test them in patients. In addition, such a mathematical model could help to choose strategies that are both medically and economically justified because they are the most likely to eventually yield clinical benefit.

For the first time (to our knowledge), our study introduces such a model that integrates radiotherapy combined with two important types of immunotherapy: the blockades of the PD1–PDL1 axis and of the CTLA4 pathway. This model has been designed to rely on a limited number of parameters that have a biological relevance (if not an exact biological equivalent) and it can be calibrated on experimental data. The mathematical complexity has been purposely kept to a minimum by the use of a small number of discrete-time equations. Indeed, we do believe that phenomenologic modeling will be more easily transposed to routine clinical practice than bottom-up, systems biology approaches (43).

The scientific relevance of the proposed model could be checked by its ability to explain and to reproduce *in silico* a number of experimental results, from decades-old data describing the link between tumor immunogenicity and its volume, to recent and cutting-edge results on the combination between different types of immunotherapy and radiotherapy protocols. Also, the model has a certain degree of robustness with respect to biological hypotheses because the complexity of the immune system has been summarized as an interaction between antigens and a compartment of immune effectors. Though this simplification does not capture all the complexity of the interplay between the many actors of the innate and the acquired immune response, its low level of granularity is sufficient to model the effect of PD-L1 or CTLA4 blockades. The practical interest of this model relies on its capacity to compare the outcome of different strategies and to allow optimizing dosing regimen *in silico*. For example, if the disease is deemed so aggressive that it mandates the use of very risky strategies that might result in poor tolerance or even death by treatment, such an integrated model can be of tremendous help to (i) quantify and justify the benefit-risk ratio of such an option with respect to other less risky strategies, and (ii) optimize the aggressive strategy to minimize its associated risks while preserving the chances of success.

Conclusion and perspectives

The mathematical model presented can describe several experimental results on the combination between radiotherapy and immune checkpoint inhibitors targeting the PD1–PD-L1 axis and the CTLA4 pathway. Beyond the intellectual interest of achieving a mathematical description of experimental results, this model could have a practical interest by predicting the clinical outcome

of new combination of anticancer therapies and to test different scenario. In that respect, the ability to simulate Kaplan–Meier curves is a practical and intuitive way to compare different designs *in silico*, whereas the search of optimized protocols could be partially automated by using mathematical tools.

Future works will focus on the integration of such mathematical tools into clinical practice, and will therefore explore how to manage drug and radiation-induced toxicities in the optimization process. Dose–effect relationships will be investigated and a pharmacokinetic model will be integrated to better describe the relation between the experimental results and the actual dosing protocols. The combination with other therapeutic modalities such as metronomic chemotherapy or targeted agents (such as antiangiogenics) will also be the subject of future research.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J. Ciccolini is a consultant/advisory board for Celgene, Roche, Pierre Fabre. F. Barlesi is a consultant/advisory board member for BMS, Roche/Genentech, Astra-Zeneca. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: R. Serre, N. André, X. Muracciole, D. Barbolosi

Development of methodology: R. Serre, C. Meille, N. André, F. Barlesi, D. Barbolosi

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): R. Serre, L. Padovani, X. Muracciole, D. Barbolosi

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): R. Serre, L. Padovani, N. André, F. Barlesi, D. Barbolosi

Writing, review, and/or revision of the manuscript: R. Serre, S. Benzekry, C. Meille, N. André, J. Ciccolini, F. Barlesi, X. Muracciole, D. Barbolosi

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): R. Serre, J. Ciccolini, D. Barbolosi

Study supervision: R. Serre, X. Muracciole, D. Barbolosi

Acknowledgments

The authors thank the Ligue Contre le Cancer de Corse du Sud for its support.

Grant Support

This work was partly supported by the A* MIDEX Mars Project Funding. This study was supported by a public grant from the French State, managed by the French National Research Agency (ANR) in the frame of the "Investments for the future" Program IdEx Bordeaux - CPU (ANR-10-IDEX-03-02).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 14, 2016; revised May 3, 2016; accepted May 25, 2016; published OnlineFirst June 14, 2016.

References

- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015; 27:450–61.
- Derer A, Deloch L, Rubner Y, Fietkau R, Frey B, Gaipl US. Radio-immunotherapy-induced immunogenic cancer cells as basis for induction of systemic anti-tumor immune responses—pre-clinical evidence and ongoing clinical applications. *Front Immunol* 2015;6:505.
- Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol* 2010;31:363–72.
- Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Radiobiologie. Paris, France: Hermann; 1986.
- Barendsen G. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8: 1981–97.
- Dale RG. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br J Radiol* 1985;58:515–28.
- Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol* 1989;62:679–94.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329–60.
- Vaage J. Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity. *Cancer Res* 1973;33:493–503.

Serre et al.

10. Deckers PJ, Davis RC, Parker GA, Mannick JA. The effect of tumor size on concomitant tumor immunity. *Cancer Res* 1973;33:33–9.
11. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity: an explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 1980;151:69–80.
12. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, et al. Irradiation and anti–pd-1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Exp Med* 2014;214:687.
13. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:256–65.
14. Twyman-SaintVictor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 2015;520:373–7.
15. Golden EB, Chhabra A, Chachoua A, Adams S, Donach M, Fenton-Kerimian M, et al. Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *Lancet Oncol* 2015;16:795–803.
16. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8⁺ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* 2009;114:589–95.
17. Schae D, Comin-Anduix B, Ribas A, Zhang L, Goodlick L, Sayre JW, et al. T-cell responses to survivin in cancer patients undergoing radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:4883–90.
18. Wattenberg MM, Fahim A, Ahmed MM, Hodge JW. Unlocking the combination: potentiation of radiation-induced antitumor responses with immunotherapy. *Radiat Res* 2014;182:126–38.
19. Wattenberg M, Kwilas A, Gameiro S, Dicker A, Hodge J. Expanding the use of monoclonal antibody therapy of cancer by using ionising radiation to upregulate antibody targets. *Br J Cancer* 2014;110:1472–80.
20. Barcellos-Hoff M, Derynck R, Tsang M, Weatherbee J. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 1994;93:892.
21. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor- β and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:5262–70.
22. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent pd-1 blockade. *Cancer Res* 2014;74:5458–68.
23. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* 1999;17:56–72.
24. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngeart JK, Babb JS, Formenti SC, et al. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-ctla-4 antibody. *Clin Cancer Res* 2009;15:5379–88.
25. Hiniker SM, Chen DS, Reddy S, Chang DT, Jones JC, Mollick JA, et al. A systemic complete response of metastatic melanoma to local radiation and immunotherapy. *Translat Oncol* 2012;5:404–7.
26. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med* 2012;366:925–31.
27. Golden EB, Demaria S, Schiff PB, Chachoua A, Formenti SC. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* 2013;1:365–72.
28. Dubben H-H, Thames HD, Beck-Bornholdt H-P. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. *Radiother Oncol* 1998;47:167–74.
29. Alexander BM, Othus M, Caglar HB, Allen AM. Tumor volume is a prognostic factor in non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79:1381–7.
30. Werner-Wasik M, Swann RS, Bradley J, Graham M, Emami B, Purdy J, et al. Increasing tumor volume is predictive of poor overall and progression-free survival: secondary analysis of the radiation therapy oncology group 93-11 phase i-ii radiation dose-escalation study in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:385–90.
31. Soliman M, Yaromina A, Appold S, Zips D, Reiffenstahl C, Schreiber A, et al. Gtv differentially impacts locoregional control of non-small cell lung cancer (nscl) after different fractionation schedules: subgroup analysis of the prospective randomized chartwell trial. *Radiother Oncol* 2013;106:299–304.
32. Segal N, Hamid O, Hwu W, Massard C, Butler M, Antonia S, et al. A phase I multi-arm dose-expansion study of the anti-programmed cell death-ligand-1 (pd-1) antibody med4736: preliminary data. in *Ann Oncol* 2014;25(Suppl_4):iv365.
33. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances mhc class i expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006;203:1259–71.
34. Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer Cell* 2007;12:300–1.
35. Ohshima Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Harada H, Suzuki A, Sato M, et al. γ -irradiation induces p2x₇ receptor-dependent atp release from b16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:40–6.
36. Tang C, Wang X, Soh H, Seyedin S, Cortez MA, Krishnan S, et al. Combining radiation and immunotherapy: a new systemic. *Cancer Immunol Res* 2014;2:831–8.
37. Filatenkov A, Baker J, Mueller A, Kenkel JA, Ahn G-o, Dutt S, et al. Ablative tumor radiation can change the tumor immune cell microenvironment to induce durable complete remissions. *Clin Cancer Res* 2015;2824.
38. Fowler JF. The phantom of tumor treatment-continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol* 1991;22:156–8.
39. Benzekry S, Lamont C, Beheshti A, Hlatky L, Hahnfeldt P. Classical mathematical models for description and forecast of preclinical tumor growth. *PLoS Comput Biol* 2014;10:e1003800.
40. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and cd4⁺ t-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995;332:143–9.
41. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014;32:1020–30.
42. Kalra S, Rini B, Jonasch E. Alternate sunitinib schedules in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2015;26:1300–4.
43. Barbolosi D, Ciccolini J, Lacarelle B, Barlesi F, André N. Computational oncology - mathematical modelling of drug regimens for precision medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:242–54.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy

Raphael Serre, Sebastien Benzekry, Laetitia Padovani, et al.

Cancer Res 2016;76:4931–4940. Published OnlineFirst June 14, 2016.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3567
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2016/09/07/0008-5472.CAN-15-3567.DC1

Cited articles	This article cites 41 articles, 14 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/17/4931.full#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 12 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/17/4931.full#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/17/4931 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Premier article: données supplémentaires

Ces données supplémentaires relatives à l'article reproduit plus haut apparaissent telles qu'elles ont été publiées: elles sont rédigées en anglais.

Aggregated survival probability to irradiation

According to the linear-quadratic model the survival probability of one cancer cell to a dose of d Gy of radiation is given by [1, 2, 3]:

$$P(d) = \exp(-\alpha \cdot d - \beta \cdot d^2)$$

where α and β are the constants of the linear-quadratic model (constant, positive real values). This is not supposed to model an *instantaneous* cell death: the original linear-quadratic model is used on relatively larger time scales (spanning months or years) than the time scale in this article (spanning days or weeks).

However, in a dynamic tumor volume model, a *delay* exists between the time of *irradiation* and the time of *death* of the tumor cell and this delay is long enough for the cell to undergo a small number of mitosis during which the tumor size may continue to grow [4]. Another reason for the tumor growing in *size* but not in *number* of tumor cells, is the inflammatory process provoked by irradiation and the resulting translocation of immune effector cells inside the tumor microenvironment. Even though this effect has not been modeled here, it could be included by adding a certain proportion of the compartment L_n to the tumor volume. Therefore the linear-quadratic model was modified to distribute, or spread, the death of the tumor cells over a certain time span, by defining *daily weights*: $w_0, w_1, w_2, \dots$ whose sum is equal to 1, and by defining the survival probability k days after receiving a radiation dose of d Gy as:

$$P_k(d) = \exp\left((- \alpha \cdot d - \beta \cdot d^2) \cdot W_k\right)$$

Where $W_k = \sum_{j=0}^k w_j$ is the partial sum of the daily weights up to day k .

Asymptotically, for sufficiently large values of k , $W_k = 1$ (by definition of the daily weights) and the survival probability equals that of the linear-quadratic model, which is the expected property.

Hence, for a given dose regimen $d = (d_1, \dots, d_n)$ on days $(1, \dots, n)$, the survival probability at time n is then given by

$$S_n(d) = \prod_{k=1}^{n-1} P_{n-k}(d_k)$$

The daily weights have been defined by using a log-normal density probability function (which ensures that they have positive values, that their sum always equals 1, and creates a bell-shaped probability of occurrence of death as a function of time). The short-term variation of the simulated tumor mass obtained with that assumption could be made close to published experimental data of tumor volume after irradiation, such as those in [4], by adjusting the mean and standard deviation of the log-normal probability density function. All simulations used a mean of 5 days and a standard deviation of 1.5 days, i.e. 95% of the killed cells died between 2 and 8 days after irradiation. If longer experimental time scales had been used, this modification of the linear-quadratic model would have been unnecessary and its original equations would have been used.

Of course, the linear-quadratic model is not the only one that could be used, especially if large doses are administered (typically, in excess of 6 to 8 Gy), because of its tendency to over predict the number of cells killed. A mathematically simple modification of the linear-quadratic model could be a switch to a linear model for doses above a certain level, as in [5]. For a comprehensive review of several possible models, see for example [4].

How to compute a probability of tumor rejection

This section describes how to transform the activity of the immune system against the primary tumor site into a probability of tumor rejection at a distant metastatic site, as in Figure 2, to describe the results published in [6]. Since the primary tumor volume increases at a quasi-constant rate μ_p , it follows that the activity of the immune system against the primary tumor site must be smaller than μ_p , since in the proposed model immunological attack is the only cause of cell loss (in the absence of irradiation). What is the probability of the immune system rejecting a hypothetical metastase? Since it is well known that human metastases have shorter doubling times than their primary tumor [7], which isn't controlled by the immune system, one could object that this probability has to be zero. However, this is not what happens experimentally. To explain this, it was hypothesized that *synthetic* metastases, that are implanted by the experimentator in predefined locations of the animal, do not benefit from the *unusually favorable milieu into which secondary tumors tend to be seeded*, as cited in [8].

It was therefore assumed that the initial growth rate of an *experimental* metastatic site μ_M can be considered smaller than μ_p . For simplicity, it was also assumed that the immune system activity on the metastatic site is equal to Z_n . It follows that metastatic sites may be rejected if $\mu_M < Z_n$. Since metastatic sites have a certain degree of randomness in their initial properties (such as volume, localisation, interaction with their host animal...), their growth rate was assumed to follow a log-normal distribution of mean $\ln(\mu_M)$ and standard deviation S .

Hence, if a metastatic site is implanted on a mice N days after the implantation of the primary tumor, its rejection occurs if $\mu_M < Z_{prm,N} + Z_{sec,N}$, where μ_M is a random variable and $Z_{prm,N} + Z_{sec,N}$ is given, and this event has a probability:

$$P(N) = \int_{-\infty}^{\ln(Z_{prm,N} + Z_{sec,N})} f(x) dx$$

Where f is a Gaussian density: $f(x) = \frac{1}{S \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(-\frac{(x - \ln(\mu_M))^2}{2 \cdot S^2}\right)$ This formula has been used to transform Z_N , the activity of the immune system at the primary tumor site on day N , into a probability of tumor rejection.

Model parameters: numerical values and definitions

The table 1 contains numerical values for the parameters that were used to produce the figures provided in this paper. When a parameter is not necessary to produce a result, its value is marked as *NA* (for example, in experiments that do not use radiation, no value for α or β are provided, etc.). Drug concentrations are given in arbitrary units since this is a pure PD model; actual concentration units could be used at a later stage if a PK model is added.

The table 2 summarizes the model parameters and give their unit (when applicable).

Parameter	Figure 2	Figure 3	Figure 4	Figure 5
α	NA	NA	0.05	0.05
β	NA	NA	0.005	0.005
p_1	NA	1.8	2	0.441
c_4	NA	0	0	150
ρ	0.5	0.5	0.1	0.1
ψ	NA	NA	20	20
μ	0.14	0.14	0.14	0.135 or 0.108
ω	0.007	0.007	0.007	0.007
γ	0.128	0 or 0.009	0.0314	0.0314
r	5	5	5	5
κ	0.01	0.01	0.01	0.01
λ	0.15	0.15	0.15	0.15
ϕ	0.1	0.1	0.1	0.1

Table 1: Values of parameters used in the model.

NA: Not Applicable, or (equivalently) set to zero.

Parameter	Description	Unit
α	linear radiosensitivity of tumor cells	Gy^{-1}
β	quadratic radiosensitivity of tumor cells	Gy^{-2}
p_1	concentration of immunotherapy treatment (PD1-PD-L1 axis)	<i>none</i> *
c_4	concentration of immunotherapy treatment (CTLA4 pathway)	<i>none</i> *
ρ	natural daily rate of production of tumor antigens	<i>none</i>
ψ	daily rate of production of tumor antigens by radiation-killed tumor cells	<i>none</i>
μ	daily growth rate of the tumor	<i>none</i>
ω	sensitivity of the <i>primary</i> immune response to immune effectors	<i>none</i>
γ	max value of the propensity of the <i>primary</i> response to induce a <i>secondary</i> response	<i>none</i>
γ/r	min value of the propensity of the <i>primary</i> response to induce a <i>secondary</i> response	<i>none</i>
κ	sensitivity of the <i>primary</i> immune response to tumor down-regulation	<i>none</i>
λ	daily transformation of tumor antigens into immune effectors	<i>none</i>
ϕ	daily wash-out of the immune effectors	<i>none</i>
Variable	Description	Unit
T_n	tumor mass	g
A_n	tumor antigens	<i>none</i>
L_n	immune effectors	<i>none</i>
$Z_{prm,n}$	activity of the primary immune response	<i>none</i>
$Z_{sec,n}$	activity of the secondary immune response	<i>none</i>
S_n	ratio of tumor cells that survive on day $n + 1$ to irradiation received up to day n	<i>none</i>

Table 2: Definitions of parameters and variables used in the model.

* : concentrations have been left without unit because this is a pure PD model, but actual concentrations units would be used if a PK model was added.

Discussion on the mathematical formulation of Equation 4

Let us imagine a chemical reaction by which these $\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n$ immunomodulatory factors combine with L_n immune effectors to produce *exhausted* or *deactivated* effectors that have lost their anti-tumor activity. As a first approximation, it seems reasonable to assume that the law of Guldberg and Waage holds for this chemical equilibrium, i.e, if x denotes the fraction of free, or active immune effectors, there exists a constant K_1 such as:

$$\frac{(1-x) \cdot L_n}{x \cdot L_n \cdot \kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n} = K_1$$

it follows that the proportion x of active immune effectors is:

$$x = \frac{1}{1 + K_1 \cdot \kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n}$$

If we include the constant K_1 inside κ , we obtain Equation 4 for $p_1 = 0$.

Let us now assume that an immunotherapy drug in concentration p_1 binds to these immunomodulatory factors and inactivate them. This drug is either an anti-PD1 or anti-PD-L1 monoclonal antibody, depending of the context. For an anti-PD-L1, the fraction of free immunomodulatory factors is $\frac{1}{1 + K_2 \cdot p_1}$, where K_2 is the constant from the law of Guldberg and Waage. Without loss of generality, we can include K_2 inside p_1 and we obtain Equation 4 with a concentration p_1 of an anti-PD-L1 drug. Symetrically, for an anti-PD1 drug, the same reasoning holds if we assume that κ is proportionnal to the fraction of free PD1 receptors, since κ contains the above described constant K_1 which describes the affinity between immunomodulatory factors and their receptors on the immune effectors. Hence, with an anti-PD1 drug, κ has to decreases in proportion with the number of free receptors and must be replaced by $\kappa / (1 + K_3 \cdot p_1)$, where K_3 is again another equilibrium constant. This allows us to derive the same mathematical formulation for an anti-PD1 and for an anti-PD-L1 drug.

Concurrent blockade of PD1 and PDL1

Though this concurrent blockade is relatively less synergistic it may be considered sometimes and we provide here a formula derived from the previous discussion. If p_1 and p_2 are the concentrations of the drugs, Equation 4 becomes:

$$Z_n^{prm} = \frac{\omega \cdot L_n}{1 + \frac{\kappa \cdot T_n^{2/3} \cdot L_n}{(1+p_1)(1+p_2)}}$$

Where as already discussed, equilibrium constants K_1 and K_2 have been included in p_1 and p_2 .

Modelling of redundant immunomodulatory factors: the example of PD-L1 and PD-L2

Since it is known that PD-L2 is another ligand of PD-1, with similar immunomodulatory properties [9], it is reasonable to question the validity of Equation 4 in the context of more than one immunomodulatory factor. For this question to be relevant, we must assume that the anti-PD-L1 drug in concentration p_1 has a different affinity for the ligand PD-L2. For both simplicity and conservatism, we assume that the anti-PD-L1 drug does not bind at all to PD-L2.

The quantity of immunomodulatory factors produced by the tumor is now the sum of the quantities of PD-L1 and PD-L2 ligands:

$$\kappa T^{2/3} L = (\kappa_1 + \kappa_2) T^{2/3} L$$

Let x be the ratio of free or active immune effectors, that do not bind to neither PD-L1 nor PD-L2, let x_1 be the proportion of inactive immune effectors that bind to PD-L1 and let x_2 be the proportion of inactive immune effectors that bind to PD-L2. Let us assume that the chemical equilibrium for each reaction is governed by the law of Guldberg and Waage whose K_1 and K_2 are the associated constants. We can write:

$$x + x_1 + x_2 = 1$$

$$\frac{x_1 \cdot L}{x \cdot L \cdot \kappa_1 T^{2/3} L} = K_1$$

$$\frac{x_2 \cdot L}{x \cdot L \cdot \kappa_2 T^{2/3} L} = K_2$$

We can solve directly the ratio of active effectors:

$$x = \frac{1}{1 + (\kappa_1 K_1 + \kappa_2 K_2) T^{2/3} L}$$

Which proves that the general form of Equation 4 is still valid if one adds PD-L2. By recurrence, Equation 4 is valid for any number of ligands that would have a similar mechanism of action than PD-L1.

If, as previously assumed, the immunotherapy drug in concentration p_1 binds specifically to PD-L1 and has zero affinity for PD-L2, by the same reasoning, the ratio of free PD-L1 is $\frac{1}{1 + K_3 p_1}$, where K_3 is again a constant of chemical equilibrium, that we can integrate inside p_1 and we can rewrite x :

$$x = \frac{1}{1 + \left(\frac{\kappa_1 K_1}{1+p_1} + \kappa_2 K_2 \right) T^{2/3} L}$$

In summary, to take into account the existence of more immunomodulatory factors with a similar mechanism than PD-L1, such as PD-L2, it suffices to rewrite Equation 4 as:

$$Z_{prm,n} = \frac{\omega \cdot L_n}{1 + \left(\kappa_0 + \frac{\kappa_1}{1+p_1} \right) T_n^{2/3} \cdot L_n}$$

Where $\kappa_0 > 0$ is a new constant.

Discussion on the mathematical formulation of Equation 5

This section explains the rationale for the term $\frac{1+c_4}{r+c_4}$. Let APC denote the number of Antigen Presenting Cells and let Th be the number of CD4+ T cells. We assume that all Antigen Presenting Cells considered here are loaded with tumor antigens, that they present to Th cells. There are three possibilities:

- APC can engage the inhibitory CTLA4 receptor of a CD4+ T cell, with an affinity K^- , which yields a deactivated CD4+ T cell, whose proportion is denoted by Th^-
- APC can engage the CD28 co-stimulatory receptor of CD4+ T cell, with an affinity K^+ , which yields an activated CD4+ T cell, whose proportion is denoted by Th^+
- APC may not interact with any CD4+ T cells, and the proportion of these *free* T cells is denoted by Th^0

Note that the affinity of APC is greater for the inhibitory CTLA4 than for the co-stimulatory CD28 ($K^- > K^+$), which explains that the activation of CD4+ T cells requires that the antigenic stimulation exceeds some threshold before triggering the CD4 response; this is maybe a stabilizing mechanism of the immune response that helps inhibiting auto-immunity. If one assumes that a chemical equilibrium holds and that the law of Guldberg and Waage gives a good approximation of it, we can write that:

$$Th^0 + Th^+ + Th^- = 1$$

$$APC \times Th^0 \times K^+ = Th^+$$

$$APC \times Th^0 \times K^- = Th^-$$

Hence:

$$Th^+ = \frac{1-Th^0}{1+K^-/K^+}$$

Now, if one assumes that an anti-CTLA4 agent in concentration c_4 binds to the CTLA4 receptors and hides them from the APC, then the affinity K^- is expected to decrease along with the number of free CTLA4 receptors. Assuming again that a chemical equilibrium holds for this reaction, one can replace K^- by $K^-/(1 + K \cdot c_4)$ where K is the constant of this equilibrium. Then, the new proportion of activated CD4+ T cells become:

$$Th^+ = \frac{(1-Th^0) \cdot (1+K \cdot c_4)}{1+K^-/K^+ + K \cdot c_4}$$

Which proves the general form of Equation 5 if we include the constant of equilibrium K in the concentration c_4 . Since $K^-/K^+ > 1$, this also proves that the constant r in Equation 5 is greater than 2. Also, the larger the ratio K^-/K^+ between the affinity of APC for inhibitory and co-stimulatory receptors, the bigger the necessary concentration of anti-CTLA4 to activate a significant proportion of CD4+ T cells. Hence the greater this concentration, the greater the risk of unwanted activation of CD4+ T cell specific antigens that are totally unrelated to the tumor, for example auto-antigens, and the bigger the risk of auto-immune disease.

One could object that Th^0 , the proportion of free CD4+ T cells is unlikely to be constant over time. For simplicity, it was nevertheless assumed. Another reason could be that $1 - Th^0 \simeq 1$: if the antigenic stimulation is large enough, APC could engage almost all CD4+ T cells and the vast majority of them should be either in the activated or in the inhibited state.

Références bibliographiques pour les données supplémentaires

[1] G. Barendsen, "Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses," International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, vol. 8, no. 11, pp. 1981–1997, 1982.

[2] R. G. Dale, "The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy," The British journal of radiology, vol. 58, no. 690, pp. 515–528, 1985.

[3] J. F. Fowler, "The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy," The British journal of radiology, vol. 62, no. 740, pp. 679–694, 1989.

[4] M. Tubiana, J. Dutreix, and A. Wambersie, "Radiobiologie. hermann," 1986.

[5] C. Park, L. Papiez, S. Zhang, M. Story, and R. D. Timmerman, "Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of

ablative radiotherapy,” *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 70, no. 3, pp. 847–852, 2008.

[6] J. Vaage, “Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity,” *Cancer research*, vol. 33, no. 3, pp. 493–503, 1973.

[7] A. Charbit, E. Malaise, and M. Tubiana, “Relation between the pathological nature and the growth rate of human tumors,” *European Journal of Cancer* (1965), vol. 7, no. 4, pp. 307–315, 1971.

[8] E. J. Hall and A. J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 1993.

[9] Y. Latchman, C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, et al., “Pd-l2 is a second ligand for pd-1 and inhibits t cell activation,” *Nature immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 261–268, 2001.

Deuxième article

Introduction

Objectifs

L'importance du choix du fractionnement pour l'immuno-radiothérapie est reconnu par de nombreux auteurs, mais il n'existe pas de modèle approprié ni de consensus sur un fractionnement optimal (106).

Des expérimentations animales ont montré que des schémas avec des doses radiobiologiques identiques (selon le modèle linéaire-quadratique) pouvaient avoir un potentiel de stimulation de l'immunité très différent: ainsi, en présence d'un inhibiteur de checkpoint, un schéma de 3 x 8 Gy stimule plus la réponse immunitaire anti-tumorale que le schéma 5 x 6 Gy (80). Cependant, les schémas d'irradiation fractionnés, les plus répandus en clinique, sont rarement étudiés dans les études sur animal, qui documentent majoritairement les effets des doses uniques⁴¹. Globalement, les études expérimentales en monodose montrent que l'effet abscopal serait dose-dépendant jusqu'à un certain point (peut-être situé vers 7-8 Gy), puis disparaîtrait progressivement au-delà de 10-15 Gy par fraction (80,135) et cette atténuation passerait par l'activation d'une exonucléase Trex1 (79). Cependant les schémas fractionnés prolongés, à faible dose par fraction (1.8 - 2 Gy), sont encore les plus fréquemment utilisés en clinique, pour d'excellentes raisons radiobiologiques de contrôle local et de tolérance. Mais il existe des raisons théoriques, et depuis peu des arguments cliniques, pour douter de leur efficacité à provoquer une réponse immunitaire systémique: déplétion prolongée des effecteurs immunitaires ausein du microenvironnement tumoral, lymphopénies induites, faible quantité ou faible immunogénicité des antigènes tumoraux libérés par fraction (voir section immuno-radiothérapie). Des données cliniques récentes vont dans le même sens: une analyse en sous-groupe de l'essai d'immuno-radiothérapie du MDACC avec pembrolizumab dans le cancer du poumon a montré un taux d'effet abscopal quatre fois plus grand avec la stéréotaxie (50 Gy en 4 fractions) qu'avec la radiothérapie

⁴¹ Les raisons du choix majoritaire de la dose unique ne sont pas claires. Il est possible que l'aspect pratique joue un rôle important (pas de problème de reproductibilité du positionnement, moindre contrainte de disponibilité du LINAC). Il faut donc saluer l'équipe de S. Formenti et S. Demaria pour leur travaux sur des schémas fractionnés réalistes et utilisables en clinique.

classique avec hypofractionnement modéré (45 Gy en 15 fractions): 38% vs 10% (tendance, $p=0.11$) (93).

Or, on a présenté (section immunothérapie) les taux de réponse attendus du pembrolizumab *monothérapie*: ce taux de 10% obtenue avec radiothérapie classique et pembrolizumab est dans le bas du spectre, compatible avec une *absence de potentialisation*, voir une légère *antagonisation* de l'immunothérapie par la radiothérapie classique.

Par ailleurs, cet essai du MDACC montre aussi qu'il est possible de concilier radiothérapie stéréotaxique à dose *ablative* (4 x 12.5 Gy) et obtention d'un effet abscopal, relativisant la notion de dose par fraction optimale sensée être de 8 Gy. Les résultats de cet essai n'étaient pas connus à l'époque de la publication de notre modèle (136), mais on montrera qu'ils sont bien décrits par celui-ci.

Globalement, il semble utile de progresser dans la modélisation du fractionnement en immuno-radiothérapie en proposant un modèle mathématique simple d'utilisation, étendant le modèle linéaire-quadratique, qui permette d'intégrer des résultats expérimentaux et cliniques, afin de tester numériquement des hypothèses de fractionnement pour éviter le double écueil des schémas classiques (radiobiologiquement efficaces et sûrs, mais relativement peu immunogènes) et des schémas stéréotaxiques plus immunogènes mais à dose sub ablative.

L'objectif d'optimiser le fractionnement pour l'immuno-radiothérapie peut s'envisager du point de vue de son *efficacité* ou de ses *effets secondaires*. Nous avons déjà discuté plus haut du possible lien entre la dose de radiothérapie et les effets secondaires auto-immuns (irAEs): à ce jour, il existe encore assez peu de données de tolérance et nous avons donc choisi de modéliser l'efficacité, en fonction du fractionnement utilisé.

Limites de la modélisation du premier article

Initialement, il a été envisagé d'utiliser le premier modèle publié, puisqu'il est adaptable et contient toutes les équations utiles. A la réflexion, ce modèle ne nous sembla pas le mieux maniable: il est spécifique d'un certain type d'immunothérapie (des inhibiteurs de checkpoint anti PD1:PDL1 et anti CTLA 4) et n'aurait donc pas pu s'adapter simplement à d'autres immunothérapies. Or il était très plausible que les immunothérapies soient amenées à se diversifier, à se combiner et il semblait possible que certaines pourraient devenir obsolètes (par exemple les anti CTLA 4 avaient alors

perdu beaucoup de terrain face aux anti PD1:PDL1, et il semblait plausible que les CAR-T cells soient employées dans certaines tumeurs solides⁴²). Il nous est donc apparu plus pertinent de chercher un modèle polyvalent, non spécifique d'une classe particulière d'immunothérapie.

De plus, le premier modèle est fortement paramétré: il utilise par exemple une modélisation de la croissance tumorale (temps de doublement, etc) et plusieurs paramètres non observables qui ont été déterminés par un processus de calibration délicat nécessitant des données expérimentales. Sa capacité à être utilisé par des non-spécialistes de la modélisation est donc limitée. Après la publication de notre premier modèle, certains auteurs ont continué d'explorer la dimension mécanistique de manière plus fine avec des modèles nécessitant plus de paramètres non observables (137) : conceptuellement intéressants mais de mise en œuvre délicate, aussi souhaitons-nous dépasser ce type d'approche complexe.

Enfin, si le premier modèle permettait d'explorer numériquement des scénarios très variés (séquencement alternatifs, etc), nous souhaitons répondre à des questions précises: est-il possible de quantifier l'immunogénicité d'un schéma *quelconque* de radiothérapie ? Peut-on obtenir une quantification d'immunogénicité *indépendante* de l'immunothérapie? Peut-on construire un modèle qui englobe le modèle linéaire quadratique et ne nécessite que très peu de paramètres supplémentaires (un ou deux au maximum) ? Peut-on choisir des paramètres intuitifs, et extrapolables à partir de données expérimentales publiées sans nécessiter de calibration complexe ni de compétence en modélisation ? En résumé: peut-on construire un modèle de fractionnement pour les oncologues-radiothérapeutes (et non les modélisateurs) pratiquant l'immuno-radiothérapie?

Présentation du deuxième modèle

Pour ce deuxième modèle, nous avons considéré que l'impact du fractionnement (dose par fraction et temps inter-fraction) est l'élément essentiel pour moduler la *disponibilité* des effecteurs immunitaires à l'intérieur du microenvironnement tumoral.

On suppose que chaque irradiation entraîne l'apoptose ou la nécrose d'une fraction de cellules tumorales, donnée par l'équation du modèle linéaire quadratique et ses deux paramètres de radiosensibilité α et β .

⁴² Ironiquement, ces deux intuitions se sont révélées, pour le moment, complètement fausses.

Comme le modèle linéaire quadratique ne fait aucune hypothèse sur la dynamique de cette mort cellulaire, nous introduisons un facteur temps qui décrit la *cinétique* à laquelle les cellules irradiées meurent. Cette cinétique est décrite par un temps caractéristique, noté T_d (*time to death*) qui correspond à la durée après l'irradiation pour que 50% des cellules soient effectivement mortes. Typiquement, ce paramètre est de l'ordre de quelques jours, et pour les applications numériques, il a donc été fixé semi-arbitrairement à 3 jours, en cohérence avec des notions de radiobiologie souvent présentées dans des manuels de référence⁴³. La distribution du délai entre l'irradiation et la mort cellulaire varie entre quelques heures et quelques jours, et le pic de mort cellulaire est observé approximativement à $T_d = 3$ jours. Il est simple de modifier cette valeur de T_d (le modèle est disponible via un calculateur en ligne en libre accès, ses paramètres sont directement modifiables par l'utilisateur).

L'image suivante montre des captures d'écran du calculateur en ligne, qui est disponible ici (à la date de rédaction) <http://www.smartcalculators.online>

Immunologically Effective Dose Calculator

[Link to reference article](#)

Dosing schedule

Predefined schedules: 0 0 0 0 0
My saved schedules: none

Add Week Delete Week Load schedule Clear all

Mon		Tue		Wed		Thur		Fri	
a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.
8		8		8					
3		3		3		3		3	
3		3		3		3		3	

Delete schedule from database

IED model

3 days Time to necrosis
7 days Time to immune response
none High dose attenuation level

LQ model

Medium (0.15) α
most tumors (10) α / β tumor

Growth & Repopulation Model

21 days start of repopulation
3 days repopulation: doubling time
365 days natural tumor doubling time

Il n'est pas fait d'hypothèse sur le type de mort cellulaire. Le modèle est agnostique quant à la proportion de cellules qui meurent par nécrose (inflammatoire), par apoptose (non inflammatoire, mais cependant potentiellement immunogène) ou par les autres modes de mort cellulaires identifiés à ce jour. Comme il est plausible que le type de mort cellulaire soit modulé par la dose par fraction, il s'ensuit que le modèle sera d'autant

⁴³Perez & Brady *Principles and Practice of Radiation Oncology*, 2004.

plus réaliste qu'il sera utilisé pour comparer des schémas utilisant des doses par fractions proches⁴⁴.

On suppose ensuite que les effecteurs immunitaires mettent *un certain temps* pour être recrutés dans le microenvironnement tumoral, puis pour reconnaître les antigènes (pour les lymphocytes T), les phagocyter et les présenter (pour les cellules présentatrices d'antigènes). Là encore, un temps caractéristique de traitement des antigènes par le système immunitaire est introduit, noté Tir (*time to immune response*). Ce temps Tir représente la durée pour que 50% des antigènes tumoraux aient été traités par les effecteurs immunitaires. Une distribution de forme similaire à la précédente est utilisée pour décrire la cinétique de captation des antigènes tumoraux par les effecteurs immunitaires, avec un pic d'activité approximativement égal au temps caractéristique (Tir). Dans les applications numériques, on a choisi Tir = 5 jours, en cohérence avec des données expérimentales (138) qui montrent que le pic d'infiltration par les effecteurs immunitaires se situerait entre 4 et 8 jours après une irradiation (de 5 Gy). Il s'agit de données pré-cliniques à prendre comme des ordres de grandeur, non comme des valeurs précises. Il est également possible de modifier la valeur du paramètre Tir pour simuler une infiltration plus rapide, ou plus lente, par les effecteurs immunitaires.

On voit que le modèle ne fait pas d'hypothèse sur le caractère plus ou moins immunotolérant du microenvironnement tumoral, ni sur l'utilisation d'une immunothérapie de quelque classe thérapeutique. Comme expliqué plus haut, c'est une de ses caractéristiques recherchées.

On voit aussi que la complexité du traitement des antigènes par le système immunitaire n'est, volontairement, pas représentée: les étapes successives de recrutement, phagocytose puis présentation et reconnaissance des antigènes, stimulation, co-stimulation(s), activation lymphocytaire sous réserve de la levée des inhibiteurs de checkpoints...sont entièrement masquées. Il s'agit donc d'un modèle *phénoménologique* et non (ou très peu) mécanistique.

Comment la radiothérapie module-t-elle, dans ce modèle, la disponibilité des effecteurs immunitaires au sein du micro-environnement tumoral? Elle module *positivement* cette disponibilité en favorisant le recrutement, par un effet

⁴⁴ Alternativement, on peut modifier le ratio α / β pour moduler l'immunogénicité en fonction de la dose par fraction, ce qui n'est pas "propre" théoriquement mais commode pour comparer des schémas avec des doses par fraction très différentes avec des proportions d'apoptose ou nécrose variables.

pro-inflammatoire du relargage antigénique, dont le pic temporel survient aux environs de T_d jours (3 jours), qui recrute des effecteurs dont le pic survient vers $(T_d + T_{ir})$ jours, soit $3 + 5 = 8$ jours, dans l'article.

Mais la radiothérapie module aussi *négativement* la disponibilité des effecteurs selon la modélisation suivante: les effecteurs qui ont été recrutés dans le micro-environnement tumoral sont tués (ou perdent leur fonctionnalité) immédiatement après une nouvelle dose d'irradiation.

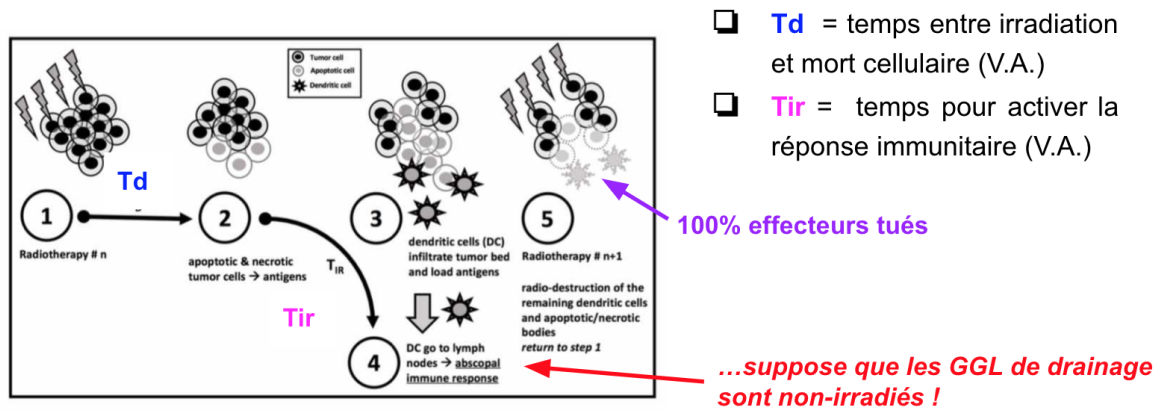
Ceci suppose des doses par fraction suffisamment importantes, de l'ordre de 1.8 - 2 Gy ou plus, doses auxquelles les lymphocytes T (naïfs⁴⁵) sont très majoritairement tués (ou stérilisés) et où les fractions survivantes des autres effecteurs immunitaires sont également très faibles. Ce modèle n'est pas valable pour les basses doses (inférieures à 0.5 - 1 Gy), un domaine d'investigation également intéressant (discuté précédemment), dans lequel les fractions survivantes lymphocytaires ne sont pas négligeables, ce qui nécessite des ajustements à la formule et modifie significativement les résultats.

On traduit la modulation *négative* de la disponibilité des effecteurs par irradiation en considérant que les antigènes *relargués* qui n'ont pas encore été traités par le système immunitaire sont perdus et ne pourront donner lieu à une réponse immunitaire. Schématiquement: une fraction des antigènes tumoraux relargués *post-mortem* est supposée avoir été captée par des cellules présentatrices, mais n'a pas encore produit une activation lymphocytaire T, au moment où survient une nouvelle dose d'irradiation; dans ce cas, cellules présentatrices et lymphocytes T présents sont tués (ou inactivés ou stérilisés) et les antigènes tumoraux sont détruits définitivement avec eux.

En ce qui concerne les antigènes *non relargués* au moment de la nouvelle dose d'irradiation, parce qu'ils font partie d'une cellule tumorale irradiée mais qui n'est pas encore arrivée au bout de son processus de nécrose ou d'apoptose. Dans ce cas, la nouvelle irradiation ne les affecte pas: ces antigènes seront relargués plus tard et pourront donner lieu à un traitement par les effecteurs immunitaires et contribuer à la réponse immunitaire.

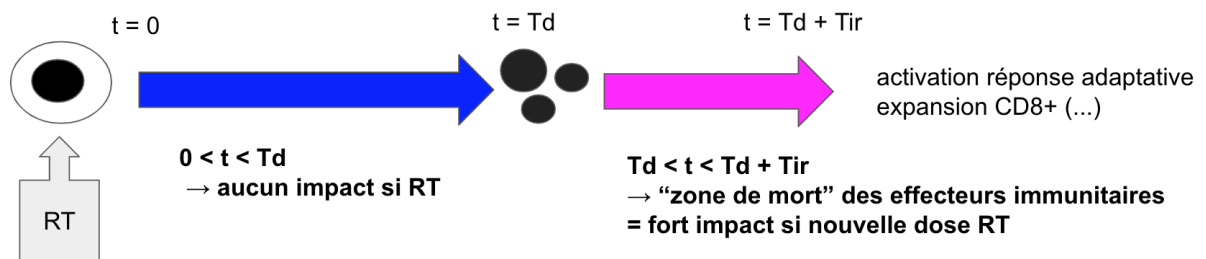
Ce processus est résumé par le schéma de principe ci-dessous:

⁴⁵ Les lymphocytes mémoires seraient moins radiosensibles (139).



Et l'impact du fractionnement se représente, avec le schéma ci-dessous:

Dose Immunologique Efficace (IED) : formule, explication qualitative



La traduction mathématique de cette cinétique quantifie la réponse immunitaire comme la somme discrète (sur chaque dose d'irradiation) des produits de *convolution* de la fonction décrivant la cinétique de la mort cellulaire multipliée par la fonction décrivant la cinétique de traitement par le système immunitaire⁴⁶.

Dose immunologique efficace

Ce modèle suppose donc que l'efficacité immunologique intrinsèque d'un schéma de radiothérapie s'évalue en fonction du nombre de cellules tumorales tuées par l'irradiation qui ont relargué des antigènes tumoraux traités par les effecteurs immunitaires, suffisamment tôt pour que ces effecteurs n'aient pas été détruits par l'irradiation suivante. Cette quantité ne dépend que des paramètres α et β du modèle linéaire quadratique et de deux temps caractéristiques décrivant la cinétique de la mort

⁴⁶ Ce n'est pas une coïncidence: la durée entre l'irradiation et l'activation de la réponse immunitaire est une variable aléatoire, somme de deux variables aléatoires indépendantes: la durée entre l'irradiation et la mort cellulaire, et la durée entre la mort cellulaire et l'activation immunitaire. Or la distribution d'une somme de variables indépendantes est le produit de convolution des fonctions de distribution des deux variables. Ceci explique la forme des équations présentées dans l'article.

cellulaire post-irradiation d'une part, et la cinétique du recrutement des effecteurs immunitaires d'autre part.

Comme il n'existe pas d'unité naturelle pour exprimer une "immunogénicité", on peut cependant en proposer une définition par l'intermédiaire d'une dose équivalente (en Gray) qui produirait le même effet. Les oncologues-radiothérapeutes sont familiers de cette pratique, car ils utilisent fréquemment des notions comme la dose équivalente en 2 Gy par fraction, notée EQD2, ou de la dose efficace biologique ou BED, lorsqu'il s'agit d'évaluer une efficacité radiobiologique (voir la section sur la radiothérapie pour les définitions).

Pour définir une *dose immunologique efficace*, on a choisi comme étalon une dose *unique*. En effet, une dose unique, sous les hypothèses de ce modèle, aurait une immunogénicité maximale puisque toutes les cellules mortes produisent des antigènes intégralement traités par le système immunitaire (en effet, aucune dose d'irradiation supplémentaire ne détruit les effecteurs).

En comparaison, l'immunogénicité d'un schéma en 2 Gy par fraction, serait très faible dans ce modèle (quelques pourcents de l'immunogénicité de la dose unique), à cause des irradiations répétées qui stérilisent les effecteurs, elle n'est donc pas un étalon adapté.

Nous avons donc exprimé l'immunogénicité d'un schéma comme celle d'une dose unique, et nous avons repris la même convention que la dose biologique efficace (BED), qui est une dose supposée administrée de manière suffisamment lente pour qu'il n'y ait pas de terme quadratique (c'est à dire, pas de β). Ce choix, qui est une simple convention (nous aurions pu choisir de garder le terme quadratique), permet d'égaliser dose biologique efficace et dose immunologique efficace dans le cas particulier d'une dose unique. Par exemple, pour une dose unique de 8 Gy avec $\alpha / \beta = 10$: BED = IED = 14.4 Gy.

On utilise aussi la définition d'*efficacité immunologique*, qui quantifie le pourcentage de volume tumoral qui contribue à l'activation immunitaire. Par définition de l'IED, cette efficacité est un nombre entre 0 et 1 qui vaut $E = 1 - \exp(-\alpha \text{ IED})$. Si l'efficacité immunologique vaut, par exemple, 20%, cela signifie que 20% des cellules tumorales ont libéré des antigènes qui ont été intégralement traités par le système immunitaire, tandis que les 80% restantes sont soit toujours en vie, soit mortes mais leur antigènes n'ont pas contribué à la réponse immunitaire, en raison des irradiations successives. Pour une dose unique de 10 Gy ou plus, cette efficacité immunologique est

généralement supérieure à 90%, tandis que pour un schéma normofractionné classique, cette efficacité n'est que de quelques pourcents.

Propriétés de la dose immunologique efficace

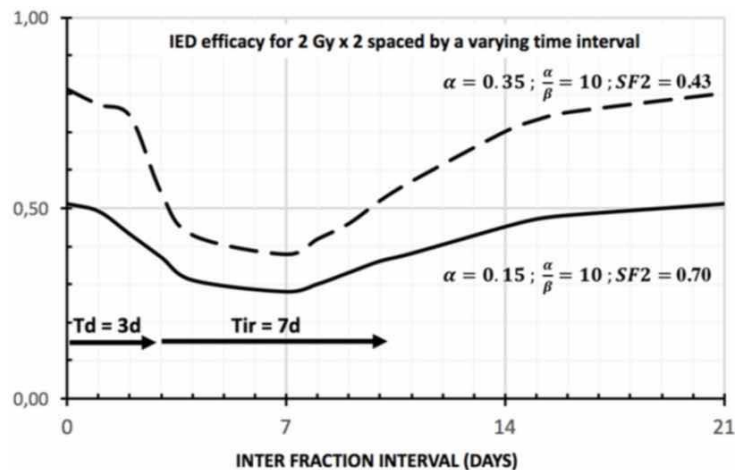
Sous ces hypothèses, une dose unique a le meilleur rendement immunologique, cependant l'oncologue-radiothérapeute doit en général *fractionner* le traitement: pour arriver à administrer une dose totale tumoricide, et pour limiter les effets secondaires tardifs qui dépendent fortement de la taille par fraction. On pense aussi que l'immunogénicité diminuerait fortement au-delà de 10 à 15 Gy par fraction, en raison de l'activation de l'exonucléase Trex (voir section immuno-radiothérapie).

En pratique, il pourrait donc être utile de quantifier l'immunogénicité de schémas composés de 3 à 5 doses successives de 6 à 10 Gy pour la stéréotaxie. Des exemples numériques sont donnés dans l'article.

On peut énoncer qualitativement les propriétés principales de la dose immunologique efficace:

- ☐ lorsque plusieurs doses d'irradiation sont données dans un intervalle de temps suffisamment petit devant le temps caractéristique de mort cellulaire (T_d), leur effet immunologique est pratiquement additif.
- ☐ Il existe une fenêtre temporelle durant laquelle les irradiations peuvent être très délétères sur l'immunogénicité du schéma car elles réduisent fortement la disponibilité des effecteurs immunitaires dans le microenvironnement tumoral. Le début de cette fenêtre temporelle est contrôlé par le premier temps caractéristique T_d , tandis que sa durée est contrôlée par le deuxième temps caractéristique T_{ir} .
- ☐ Au-delà de cette fenêtre temporelle, il est possible de ré-irradier sans impact notable sur l'immunogénicité.

Ces premières propriétés sont illustrées par le schéma ci-dessous, qui montre la dose immunologique efficace pour deux doses de radiothérapie égales de 2 Gy séparées par un intervalle de temps variable, entre 1 et 21 jours:



Par ailleurs, il existe d'autres propriétés importantes:

- ☐ les premières doses de radiation sont les plus importantes pour l'immunogénicité, tandis que les doses suivantes sont importantes pour le contrôle local au sens de la radiobiologie classique. La raison est que le nombre *absolu* de cellules tumorales décroît rapidement au début, puis beaucoup plus lentement ensuite.

De ces propriétés peuvent être tirées quelques idées directrices:

- ☐ Il serait possible d'atteindre des doses tumoricides tout en utilisant un schéma fortement immunogène, en regroupant quelques doses sur une durée suffisamment courte et en n'irradiant pas dans la fenêtre temporelle sus-citée.
- ☐ La dose immunologique efficace est atteinte rapidement en début de traitement, il est par la suite indifférent d'utiliser du normofractionnement ou de l'hypofractionnement modéré. On pourrait donc envisager des schémas biphasiques (hypofractionnement plus ou moins fort pour les premières fractions, pause de traitement suffisamment longue, puis hypofractionnement modéré⁴⁷ voir même normofractionnement).

Applications de la dose immunologique efficace

Nouveaux schémas d'irradiation

A partir de ces règles, on peut imaginer des schémas à la dose à la fois tumoricide et répartie de façon immunogène, des exemples de schémas ont été présentés dans l'article, mais il est aisé d'en proposer d'autres en fonction des contraintes.

⁴⁷ Le protocole ELAN du GORTEC constitue un exemple: 30 Gy en 10, 2 semaines de pause, 25 Gy en 10.

Le tableau ci-dessous donne une dose immunologique efficace pour divers fractionnements.

fractionnement	IED (Gy)	%IED	BED10 (Gy)
3 x 8 Gy (3 jours)	9.4	0.76	43
3 x 8 Gy (5 jours)	2.9	0.36	43
5 x 6 Gy (5 jours)	3.0	0.36	48
10 x 3 Gy (12 jours)	0.3	0.05	39
3x8 Gy J1J3J5 + 10x3 Gy J8-J19	0.2	0.03	82
3x8 Gy J1J3J5 + 10x3 Gy J15-J26	1.7	0.23	82
2x8 Gy J1J3 + 25x2 Gy J15-J46	5.5	0.56	88

Interprétation: les schémas soulignés en vert seraient a priori significativement plus immunogènes que ceux soulignés en rouge. Ainsi, seraient peu immunogènes les schémas normo-fractionnés ou à hypo-fractionnement modéré (2-3 Gy par fraction, nombre de fraction > 5). Les schémas courts en hypofractionnement (< 5 fractions) seraient plus immunogènes, mais l'augmentation de l'étalement diminuerait la dose immunologique efficace (noter la différence entre 3 jours vs 5 jours de durée totale). Des schémas hybrides, avec variation de la dose par fraction, comme celui de la dernière ligne du tableau qui mixe de l'hypofractionnement fort au début et du normofractionnement à la fin, pourraient être fortement immunogènes, à condition de respecter une période de pause suffisante entre les deux temps de traitement (ici, 12 jours semble suffisant, mais une absence de pause entre les deux temps de traitement ferait perdre le bénéfice de l'hypofractionnement).

Stérotaxie vs radiothérapie classique

Pour revenir sur l'essai du MDACC (93) qui a montré un taux d'effet abscopal de 38% pour 4 x 12.5 Gy (stéréotaxie) contre 10% pour 15 x 3 Gy (classique), en concomitant

avec du pembrolizumab, on peut calculer la dose immunologique efficace et juger de la pertinence du modèle sur des données cliniques: pour le cancer du poumon NPC, on prend $\alpha/\beta=20$, pour les deux temps caractéristiques (Td: nécrose et Tir: réponse immunitaire) on choisit deux cinétiques différentes:

☐ cinétique rapide: Td = 2 jours, Tir = 5 jours

☐ cinétique lente: Td = 5 jours, Tir = 10 jours

La cinétique rapide est en ligne avec certaines expériences animales, réalisées avec des hautes doses par fraction, par exemple (138). La cinétique lente, globalement deux fois plus longue, est moins favorable⁴⁸ et sert à obtenir une plage de valeurs plus représentative; on peut aussi supposer qu'avec de faibles doses par fraction, la cinétique de mort cellulaire sera plus lente (part plus grande de l'apoptose par rapport à la nécrose), l'inflammation moins forte et donc le recrutement immunitaire moins dynamique. Il est donc plausible (mais à valider) que la cinétique rapide soit associée à la stéréotaxie tandis que la cinétique lente soit appropriée pour la radiothérapie classique, mais ceci ne modifie pas la suite de la discussion.

Ainsi, selon la cinétique rapide ou lente, respectivement, la dose immunologique efficace du schéma *classique* est comprise entre **0.1 et 0.3 Gy**, soit entre **2% et 4%** si elle est exprimée en efficacité (le pourcentage du volume tumoral contribuant à la réponse immunitaire).

En comparaison, la dose immunologique efficace du schéma *stéréotaxique* (en supposant une fraction tous les 7 jours calendaires, pour une durée totale de 3 semaines⁴⁹) est comprise entre **0.7 Gy et 4.4 Gy** soit entre **10% et 48%** si exprimée en efficacité, selon que la cinétique soit lente ou rapide, respectivement.

On constate donc que quelle que soit la cinétique considérée, la dose immunologique efficace est toujours *nettement plus grande pour le schéma stéréotaxique* que pour le schéma classique, et ce malgré une grande sensibilité à la cinétique. Ce résultat du modèle est cohérent avec la différence entre le taux d'effet abscopal observé en clinique entre les deux modalités (38% vs 10%).

⁴⁸ Moins favorable car le temps nécessaire à la stimulation immunitaire est plus long, ce qui augmente l'effet délétère du fractionnement sur l'immunogénicité.

⁴⁹ Une telle durée entre les fractions est représentative des pratiques courantes, même si des variations existent.

Globalement, le modèle de la dose immunologique efficace semble donc décrire, au moins qualitativement, les résultats de l'essai du MDACC (dont les résultats ont été publiés 2 ans après).

Absence d'immunogénicité de la radiothérapie classique (?)

Le modèle de la dose immunologique efficace produit-il des valeurs trop basses pour la radiothérapie classique ? Au moment des résultats de l'étude PACIFIC I, cette critique a été formulée⁵⁰, au regard des résultats positifs d'un schéma classique en 2 Gy par fraction (115). Aujourd'hui, à la lumière des résultats de l'essai du MDACC, il est permis de défendre le modèle avec plus de force. L'essai PACIFIC I avait utilisé un schéma non concomitant où la radiothérapie était terminée bien avant exposition à l'immunothérapie. L'essai du MDACC, en revanche, utilise un schéma réellement concomitant et montre un taux d'effet abscopal bien inférieur aux anticipations pour la radiothérapie *classique*: seulement 10%, contre 17% dans le bras pembrolizumab monothérapie du même essai, et de 27% à 39% de réponse objective pour le pembrolizumab monothérapie dans l'essai KEYNOTE-042 (selon que TPS est >1% ou > 50%). Devant ces chiffres, on peut même se demander si la radiothérapie classique n'aurait pas *diminué* l'efficacité de l'immunothérapie (par tous les mécanismes immunosuppresseurs déjà présentés).

Globalement, si le modèle de la dose immunologique efficace ne crédite l'irradiation classique que de quelques pourcents d'efficacité, les dernières données cliniques disponibles vont dans le sens du modèle et pourraient même indiquer qu'il surestime un effet immunologique en réalité *délétère* (possiblement lié aux lymphopénies fréquentes avec la radiothérapie prolongée à dose classique).

Cependant, l'effet plus important dans le sous-groupe de l'étude PACIFIC I qui a commencé l'immunothérapie moins de 2 semaines après la fin de la radiothérapie adjuvante, est effectivement cohérent avec une immunogénicité du normo-fractionnement. On peut risquer une explication: les volumes tumoraux irradiés étaient beaucoup plus importants dans PACIFIC I que dans l'étude du MDACC (tumeur primitive en place avec atteinte ganglionnaire vs oligométastases) ce qui peut avoir créé une stimulation antigénique suffisante malgré une immunogénicité sous-optimale du fractionnement.

⁵⁰ Lors d'une présentation orale au congrès Immunorad 2018.

Plus de données cliniques, et des analyses rigoureuses des contributions de chaque thérapeutique (par exemple en utilisant des microsimulations avec des modèles de Markov) permettront peut-être de clarifier ce point.

Sensibilité à la cinétique (immunitaire et mort cellulaire)

On a vu dans l'exemple précédent que la dose immunologique efficace varie rapidement avec les deux paramètres qui gouvernent la cinétique de la mort cellulaire d'une part et de la réponse immunitaire d'autre part, ce qui est attendu par rapport aux hypothèses du modèle. Qualitativement, la cinétique ne peut pas changer la supériorité des schémas stéréotaxiques ou fortement hypo fractionnés par rapport à la radiothérapie classique. Mais de manière plus quantitative, pour les schémas stéréotaxiques, cette dépendance à la cinétique impacte le choix du temps inter-fraction, et plus particulièrement l'espacement entre la 1ère et la 2ème fraction.

En attendant une hypothétique documentation de cette cinétique en clinique, on pourra respecter les règles suivantes:

- ☐ regrouper, quand c'est possible, les irradiations par "bloc" consécutifs ne dépassant pas 3 jours au total (par exemple administrer 3 x 8 Gy en 3 jours *consécutifs*);
- ☐ ne pas raccourcir l'espacement entre les deux premiers "blocs" de traitement à moins de 7 jours calendaires; par exemple, au moins 7 jours entre les deux premières fractions pour un 4 x 12 Gy; ceci afin de laisser "suffisamment" de temps aux effecteurs immunitaires;
- ☐ l'espacement des fractions (ou blocs) après le 2ème importe peu car la quantité absolue d'antigènes résiduels devient faible au-delà de 10 Gy de dose cumulée.

Le regroupement par "bloc" sur 2 à 3 jours est faisable dans certaines limites de dose par fraction et de localisation tumorale, et le modèle prévoit qu'elles auraient un effet immunologique constructif plutôt que destructif. Un essai clinique récent (112) a opportunément démontré la faisabilité d'un schéma 3 x 8 Gy sur 3 jours consécutifs en combinaison avec le durvalumab, en contexte néoadjuvant dans le cancer du poumon NPC, sans sur-toxicité significative⁵¹.

⁵¹ Malgré certaines limitations de cet essai (section immuno-radiothérapie), sa positivité est plutôt à mettre au crédit du modèle, qui lui prédit effectivement une bonne immunogénicité (voir article).

Au-delà de l'utilisation de ces règles empiriques, peut-on envisager de documenter ces deux paramètres de cinétique? On peut les estimer rétrospectivement sur des données cliniques, comme il est possible de tirer des estimations du ratio α/β à partir de données d'efficacité, mais à condition de construire de manière appropriée les schémas d'irradiation.

Le paramètre le plus critique à estimer semble être celui de la cinétique immunitaire: dans l'exemple du schéma de l'essai MDACC, une augmentation de 3 jours de Tir (de 7 jours à 10 jours) cause une baisse de l'efficacité immunologique de 22% à 12%, soit une baisse relative de 15% par jour supplémentaire.

En comparaison, une augmentation du paramètre de cinétique de la mort cellulaire de 3 jours à 5 jours cause une baisse de l'efficacité immunologique de 22% à 19%, soit une baisse relative de 7% par jour supplémentaire.

De plus, la cinétique immunitaire est bien moins documentée que la cinétique de mort cellulaire post irradiation (une notion radiobiologique classique), hormis quelques données expérimentales comme celles de (138) dont la méthode de détermination (invasive) est non applicable chez l'homme. De plus, il est probable que comme tout phénomène immunitaire, cette cinétique soit variable selon les tumeurs et les individus. Il serait intéressant d'estimer les paramètres de cinétique directement par des méthodes non invasives comme de l'imagerie (scanner, IRM, TEP) ou par la mesure de biomarqueurs. Les résultats préliminaires encourageants de certaines études de radiomics, cherchant à qualifier l'état immunitaire du microenvironnement tumoral de manière non invasive et facilement accessible comme un scanner, constituent un exemple encourageant (8). Cependant, l'optimisme en matière d'imagerie de la réponse immunitaire doit être modéré: le sujet n'est pas nouveau et pour le moment, les succès expérimentaux n'ont pas pu être transformés en application clinique, comme le rappelle une revue récente (140). Par exemple, l'utilisation de la TEP au FDG, pour imager la réponse inflammatoire au sein du microenvironnement tumoral et en détecter son pic en post-irradiation, semble naturelle et aurait l'avantage de reposer sur un radiotraceur largement disponible. Cependant les approches reposant sur la mesure du SUV pour quantifier l'infiltration immunitaire, ont pour le moment échoué (141). Ce problème complexe nécessite de faire la part entre le métabolisme très rapide du glucose séquestré par la tumeur contre le métabolisme plus lent lié à l'inflammation du

microenvironnement tumoral⁵², une tâche théoriquement possible avec les méthodes d'acquisition en deux temps⁵³, comme par exemple celle proposée par Barbolosi et al (142). Cette discrimination serait compliquée par l'effet de la radiothérapie, qui modifie aussi la dynamique du métabolisme. D'autres approches d'imagerie de la réponse immunitaire en TEP requièrent des radiotraceurs ad-hoc et semblent prometteuses (143) mais sont plus difficiles d'accès.

Globalement, la difficulté prévisible des méthodes directes de détermination des paramètres de cinétique chez l'homme plaide plutôt en faveur de prioriser la réalisation d'essais cliniques. Les valeurs des paramètres de cinétique, ainsi déduites, permettront alors d'optimiser les schémas d'immuno-radiothérapie dans un second temps.

Immuno-radiothérapie à dose ablative vs sub ablative

Certains auteurs travaillent désormais sur des doses non tumoricides (sub ablatives) de radiothérapie en combinaison avec des inhibiteurs de checkpoint, comme l'équipe de S. Formenti qui explore depuis longtemps les effets immunogènes du schéma 3 x 8 Gy sur 3 jours consécutifs. Par exemple, la combinaison avec le durvalumab en néo-adjuvant dans le cancer du poumon n'entraînerait pas de sur-toxicité par rapport au durvalumab monothérapie (112). La dose équivalente en 2 Gy (EQD2) est 30.6 Gy (pour $\alpha/\beta=20$), très inférieure au 66-70 Gy nécessaires pour être tumoricide dans le cancer du poumon. A l'inverse, d'autres équipes explorent des schémas à visée ablative, comme le 4 x 12.5 Gy de l'essai du MDACC (EQD2 =74 Gy pour $\alpha/\beta=20$, en réalité moins en raison de la surestimation du modèle LQ pour une telle dose par fraction).

Les schémas très hypo fractionnés à dose sous-ablative présentent l'avantage de pouvoir être délivrés sur une courte période et d'être donc très immunogène (l'efficacité immunologique du 3 x 8 Gy est de **77%** pour $\alpha/\beta=20$, Td=3j, Tir=7j, son IED = **9.7 Gy**, ce qui est nettement supérieur au schéma du MDACC, et cette immunogénicité est très stable par rapport aux paramètres de cinétique Td et Tir, un autre avantage).

En revanche, leur faible dose radiobiologique (ici, moins de 50% de la dose ablative) fait se demander si la combinaison de l'immunothérapie avec une radiothérapie aussi

⁵² Voir section *notions de cancérogenèse*, chapitre sur la reprogrammation du métabolisme cellulaire.

⁵³ Les acquisitions biphasiques en TEP au FDG permettent de connaître indirectement la vitesse de séquestration du glucose, plutôt que l'état instantané du stock de glucose (qui est moins spécifique de l'activité tumorale). Elles sont réalisées en deux temps (temps précoce, temps tardif), par exemple 30 minutes puis 60 minutes. Elles sont basées sur un modèle pharmacocinétique multi-compartimental et requièrent souvent un ou plusieurs prélèvements sanguins, ce qui limite pour le moment leur applicabilité aux essais cliniques.

peu dosée présente un intérêt par rapport à une combinaison avec chimiothérapie, qui produit des taux de résécabilité et de réponse complète au moins aussi élevés, pour des coûts plus faibles: voir cette revue récente (144). Quant aux éventuels effets bénéfiques des basses doses déjà discutés, de tels schémas utilisent des doses par fraction très supérieurs à ceux pour lesquels les effets immunogènes des basses doses ont été observés expérimentalement.

Le contrôle local devrait donc rester, à notre avis, un objectif prioritaire de l'immuno-radiothérapie et les concessions de dose envisagées avec une certaine prudence. Ceci pourrait passer par des schémas plus prolongés, un peu moins immunogènes, mais avec des modèles de fractionnement comme la dose immunologique efficace, on pourrait chercher à concilier forte dose totale et forte immunogénicité.

Limites de la dose immunologique efficace

Toxicités

Ces considérations théoriques d'efficacité ne tiennent pas compte de la toxicité. Or, si les toxicités ne sont pas contrôlées, l'immuno-radiothérapie pourrait se limiter à des doses sub ablatives, avec le risque de ne jouer qu'un rôle accessoire par rapport aux combinaisons avec des chimiothérapies ou des thérapies ciblées.

On a présenté plus haut les mécanismes supposés ainsi que les données (encore parcellaires) sur les toxicités des immunothérapies, seules et en combinaison avec la radiothérapie. S'il existait effectivement quelques données cliniques de tolérance, à l'époque où le modèle de la dose immunologique efficace a été développé (106), il n'a pas pu être identifié de méthode de modélisation de cette tolérance⁵⁴.

A l'avenir, une des priorités sera d'évaluer si les *histogrammes dose-volume* peuvent continuer à être utilisés avec l'immuno-radiothérapie, ou si les toxicités sont tellement imprédictibles qu'il faut développer un nouveau formalisme, chercher des biomarqueurs, ou intégrer de nouveaux modèles (comme la dose immunologique efficace).

⁵⁴ En particulier en raison de la non-disponibilité des volumes et doses d'irradiation aux organes à risque.

Volumes d'irradiation

Tout comme le modèle linéaire-quadratique, la dose immunologique efficace ne considère pas les volumes d'irradiation, mais ces volumes représentent un axe de recherche majeur:

- ☐ La quantité absolue d'antigènes tumoraux produits par irradiation varie en fonction pratiquement linéaire avec le volume irradié: celui-ci implique donc fortement l'immunogénicité d'un schéma de radiothérapie, tout comme le fractionnement. On a présenté un certain nombre d'essais d'immuno-radiothérapie et on a vu que désormais, de nombreux essais imposent un nombre minimum de lésions à irradier, à la suite de résultats décevants d'essai d'irradiation sur une seule lésion.
- ☐ Le volume irradié est lié à la toxicité en radiothérapie.
- ☐ Les volumes d'irradiation prophylactique concernent les aires ganglionnaires de drainage lymphatique, susceptibles d'être des sites d'extension tumorale infra-clinique. Ces aires ganglionnaires sont fréquemment irradiées par précaution, même en l'absence d'argument sur leur envahissement, sur des arguments statistiques (séries opératoires, nomogrammes basés sur des grandes séries de récurrences). Cette approche peut être valide d'un point de vue de la radiothérapie classique (quoique ce sujet soit évolutif, avec des essais d'escalade ou de désescalade dans beaucoup de localisations). En revanche, on peut sérieusement questionner cette approche dans le cadre d'une immuno-radiothérapie.

Prophylaxie ganglionnaire: amie ou ennemie?

Dans son discours de réception du prix nobel de médecine 2018, attribué pour la découverte de l'inhibiteur de checkpoint PD-1, le Pr Tasuku Honjo met explicitement en garde contre la chirurgie prophylactique des aires ganglionnaires⁵⁵ (145), car il a montré expérimentalement que la destruction du réseau lymphatique de drainage entraîne l'inefficacité des inhibiteurs de checkpoint. Les ganglions de drainage de la tumeur sont probablement le site principal de la présentation antigénique et de l'activation lymphocytaire. Les inquiétudes de T. Honjo concernant la chirurgie sont

⁵⁵ *"surgeons should avoid removing healthy lymph nodes during dissection of tumors in order to safeguard protective immune responses"*

potentiellement applicables à l'irradiation prophylactique ganglionnaire. Ces ganglions de drainage sont souvent situés à distance de plusieurs centimètres de la tumeur primitive (on peut le constater lors des procédures de repérage du ganglion sentinelle), ils sont donc techniquement *épargnables* lors de la radiothérapie. Il est pourtant une pratique très répandue de les irradier même en l'absence d'envahissement clinique. On donne deux exemples dans des localisations majeures: dans le traitement adjuvant du cancer du sein par irradiation, le premier relai ganglionnaire est le plus souvent enlevé chirurgicalement (procédure de ganglion sentinelle), tandis que l'aire axillaire est ensuite irradiée (en grande partie) à 50 Gy⁵⁶. Dans le cancer de prostate, le curage ganglionnaire étendu à visée diagnostique est fortement recommandé en cas de prostatectomie chez les patients de haut risque, alors que son intérêt thérapeutique n'est pas démontré. En cas de radiothérapie radicale de prostate, la prophylaxie des aires ganglionnaires pelviennes est pratiquée chez certains patients à haut risque et s'appuie d'ailleurs désormais sur un bon niveau de preuve, comme la récente positivité de l'étude randomisée POP-RT (146). Par ailleurs, pratiquement toutes les localisations en radiothérapie ont été, ou sont encore, concernées par des débats sur l'irradiation ganglionnaire prophylactique.

Ceci pose au moins deux questions: en cas d'irradiation classique, sans immunothérapie, mais dans la perspective éventuelle d'une immunothérapie future en cas de récurrence métastatique⁵⁷, de larges volumes d'irradiation prophylactique pourraient-ils diminuer l'efficacité d'une immunothérapie à venir? La réponse est moins évidente que dans le cas d'un curage chirurgical, puisque l'irradiation prophylactique est à dose sub-ablative et que les phénomènes de fibrose post radique peuvent se développer sur des années, il n'est donc pas évident que le réseau de drainage lymphatique soit défaillant lors d'une récurrence métastatique, en particulier si elle est relativement précoce; ceci constitue un axe de recherche clinique.

La deuxième question est plus pressante: en cas d'immuno-radiothérapie au stade localisé ou localement avancé, faut-il faire de la prophylaxie ganglionnaire ? Ceci semble

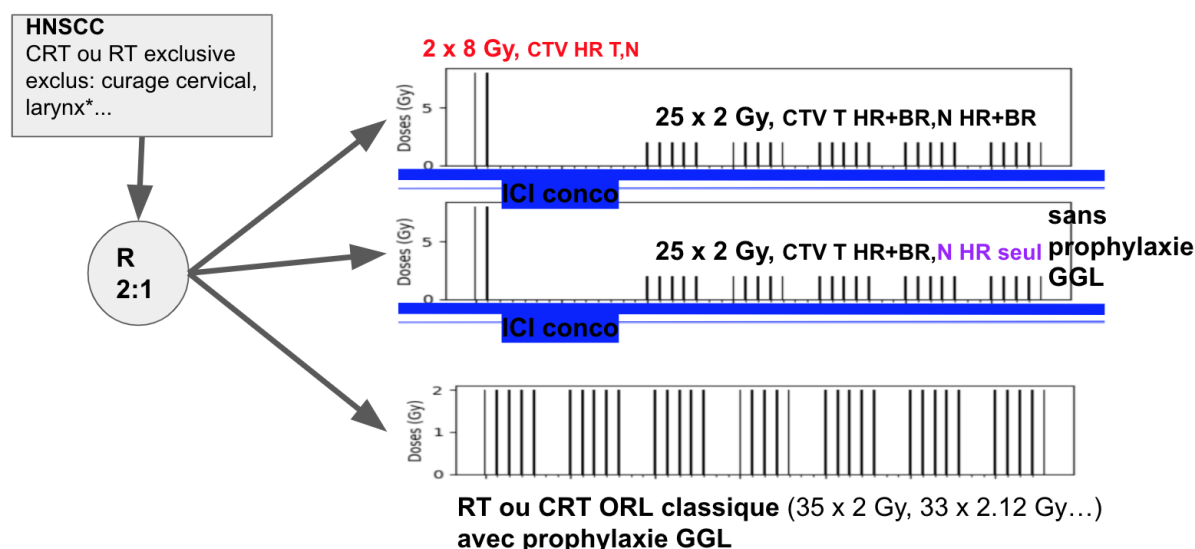
⁵⁶ Les données sur l'irradiation partielle du sein démontrent pourtant l'inutilité de traiter cette zone dans bon nombre de cancers à bas risque.

⁵⁷ La probabilité de cette rechute est d'ailleurs d'autant plus forte que l'on se pose la question de l'irradiation prophylactique ganglionnaire, donc la question est pertinente.

contre-productif du point de vue de l'immunothérapie⁵⁸, mais potentiellement utile du point de vue de la radiobiologie classique.

Le modèle de la dose immunologique efficace considère que les chaînes ganglionnaires de drainage ne sont pas irradiées, que seul le microenvironnement tumoral l'est. Dans le cas où les premiers relais ganglionnaires sont également irradiés, et d'autant plus que cette irradiation se ferait sur un mode fractionné classique, on peut anticiper une baisse significative de l'immunogénicité, quel que soit le mode de fractionnement utilisé pour la tumeur primitive⁵⁹. Ce problème des volumes prophylactiques interroge aujourd'hui certains acteurs de l'immuno-radiothérapie (106) et constitue un domaine de recherche pour l'avenir.

Le schéma ci-dessous propose le principe d'un essai clinique essayant de répondre à ces questions.



Cet essai hypothétique pourrait randomiser des patients ORL entre (chimio)radiothérapie classique et (chimio)immuno-radiothérapie concomitante avec fractionnement modifié, avec ou sans prophylaxie ganglionnaire. La dose radiobiologique classique (BED ou EQD2) et l'étalement seraient identiques entre tous les bras, mais les 2 bras en fractionnement modifiés auraient une dose immunologique efficace plus grande. L'utilisation de fractionnement modifié avec dose variable par

⁵⁸ Possiblement contributifs aux résultats décevants en immuno-radiothérapie des cancers ORL.

⁵⁹ On peut imaginer un découplage dans le temps entre l'irradiation de la tumeur primitive et la prophylaxie ganglionnaire. Un intervalle libre suffisant entre les deux séquences permettrait à la réponse immunitaire de s'effectuer dans le premier relai ganglionnaire et aux lymphocytes T activés de recirculer. D'ailleurs, cette pratique existe dans la curiethérapie de prostate suivie d'une irradiation prophylactique pelvienne séquentielle.

fraction permet d'optimiser l'immunogénicité du schéma, tout en préservant la tolérance puisque l'essentiel de la dose est délivrée en normofractionnement à 2 Gy par fraction, avec un boost initial est réalisé avec 2 doses de 8 Gy.

Microbiome intestinal

Enfin, dans une logique similaire, puisque l'on sait aujourd'hui que le tube digestif constitue le premier organe lymphoïde, une épargne maximale du tube digestif et de ses formations ganglionnaires semble indispensable pour ne pas perturber le microbiome intestinal, dont on sait l'importance pour la réponse aux immunothérapies. Sur ce point le consensus sera plus facile à obtenir, le tube digestif étant souvent contourné comme un organe à risque et épargné au maximum.

Conclusion sur la dose immunologique efficace

Nous avons présenté un modèle pour calculer l'immunogénicité intrinsèque d'un schéma fractionné de radiothérapie, conçu comme une extension du modèle linéaire quadratique et qui ne nécessite que deux paramètres supplémentaires (l'un décrivant la cinétique de la mort cellulaire par irradiation, l'autre la cinétique de la réaction immunitaire), dont on connaît déjà des valeurs expérimentales (qui sont de l'ordre de quelques jours).

Ce modèle fait l'hypothèse que le choix du temps inter-fraction est aussi important que la dose par fraction et la dose totale pour l'immunogénicité. Il permet de simuler des schémas d'irradiation hypo fractionnés à la fois immunogènes et ablatifs.

Le résultat du modèle est exprimé, au choix, comme une *dose unique équivalente* (en Gray) produisant la même stimulation antigénique (que l'on nomme la *dose immunologique efficace*), ou bien comme un *pourcentage* exprimant la proportion de la tumeur qui contribue théoriquement à la stimulation antigénique.

Ce modèle décrit de façon cohérente les différences d'immunogénicité entre des fractionnements différents, sur des données expérimentales et cliniques (à l'heure actuelle: 3 x 8 Gy, 5 x 6 Gy, 15 x 3 Gy, 4 x 12.5 Gy): les taux de réponse semblent varier en fonction de la dose immunologique efficace.

La formulation mathématique comporte une somme discrète de produits de convolution, pour utiliser le modèle sans difficulté, on peut utiliser un calculateur (en accès libre sur internet).

Ce modèle est formulé pour le normo-fractionnement et l'hypofractionnement (de préférence modéré à fort), en revanche ses hypothèses ne permettent pas de l'utiliser pour les basses doses par fraction.

Des essais cliniques et des méthodes d'imagerie (par TEP ou IRM) pourraient permettre d'améliorer la connaissance des paramètres du modèle et de progresser dans la qualité des fractionnements pour l'immuno-radiothérapie.

Dans un avenir proche, d'autres données cliniques d'immuno-radiothérapie seront disponibles et permettront de mieux cerner la validité du modèle.

Ce modèle n'aborde pas certains points importants (volumes d'irradiation, toxicités auto-immunes, pharmacodynamie spécifique de l'immunothérapie associée...).

Cependant, il représente à notre connaissance le premier modèle pratique de fractionnement adapté à l'immuno-radiothérapie.

Ce type de modèle pourrait permettre de progresser dans la découverte de fractionnements optimaux pour l'immuno-radiothérapie, comme le modèle linéaire-quadratique a servi pour l'exploration de fractionnements alternatifs en radiothérapie classique.

Immunologically effective dose: a practical model for immuno-radiotherapy

Raphaël Serre¹, Fabrice Barlesi², Xavier Muracciole³ and Dominique Barbolosi¹

¹Simulation & Modelling Adaptive Response for Therapeutics in Cancer (SMARTc), Center for Research on Cancer of Marseille, CRCM Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Université U105, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

²Multidisciplinary Oncology & Therapeutic Innovations Department, Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille, France

³Department of Radiotherapy, Oncology, CHU La Timone, Assistance Publique-Hopitaux de Marseille, Marseille, France

Correspondence to: Raphaël Serre, email: raphael.serre@inserm.fr

Keywords: immunotherapy; radiotherapy; combination; fractionation; linear-quadratic model

Received: May 02, 2018

Accepted: June 19, 2018

Published: August 07, 2018

Copyright: Serre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Objectives: Concomitant radiotherapy with immune checkpoint blockade could be synergistic. Out-of-field effects could improve survival by slowing or blocking metastatic spreading. However, not much is known about the optimal size per fraction and inter-fraction time in that new context.

Methods: The new concept of Immunologically Effective Dose (IED) is proposed: it models an intrinsic immunogenicity of radiotherapy schedules, i.e. the fraction of immunogenicity that results from the choice of the dosing regimen. The IED is defined as the single dose, given in infinitely low dose rate, that produces the same amount of abscopal response as the radiation schedule being considered. The IED uses the classic parameters of the BED formula and adds two parameters for immunogenicity that describe the local availability of immune effectors within the tumor micro-environment. Fundamentally, the IED adds a time dimension in the BED formula and describes an intrinsic immunogenicity level for radiotherapy.

Results: The IED is positively related to the intensity of the out-of-field, radiotherapy-mediated, immune effects described in some preclinical data. Examples of numerical simulations are given for various schedules. A web-based calculator is freely available.

Conclusions: Out-of-field effects of radiotherapy with immune checkpoint blockers might be better predicted and eventually, radiotherapy schedules with better local and systemic immunogenicity could be proposed.

Advances in knowledge: A model for the intrinsic level of immunogenicity of radiotherapy schedules, referred to as the Immunologically Effective Dose (IED), that is independent of the type of immunotherapy.

INTRODUCTION

The abscopal effect of radiotherapy describes a rarely observed phenomenon in which one or more metastases located out of the irradiation field regress at some point in time after radiotherapy [1]. Described more than sixty years ago, the effect was rare, unpredictable

and for these reasons, considered more like an interesting curiosity than an actual therapeutic target. Today it is largely suspected that a significant part of out-of-field effects could be mediated by the immune system, hence the recent introduction and large diffusion of immune checkpoint blockade has strongly revived interest for the subject, with promising clinical case reports [2], [3] a

sizeable amount of preclinical results [4] and the exciting on-going development of a new hybrid discipline: immuno-radiotherapy.

The out-of-field mechanism could initially involve an in-field recruitment of dendritic cells (DC) and other types of Antigen Presenting Cells (APC) in the tumour micro-environment, attracted by radiation-induced inflammation and necrosis. However, these immune effectors have a strong radio-sensitivity: lymphocytes are among the most radiosensitive cells within the body (with doses as low as 0.5 Gy already strongly cytotoxic [5]), while DC and APC may survive higher doses but quickly suffer loss of function [6]. Hence, the local availability of immune effectors could be highly impacted by the choice of interfraction time. Meanwhile, the quantity of tumour antigens could be mainly driven by the size of the dose per fraction and the radio sensitivity of tumour cells: higher doses per fraction could release larger quantities of tumour antigens and produce an increased diversity of epitopes. This reasoning, supported by experimental confirmations from the preclinical setup [8] and several clinical reports, has aroused interest in hypo-fractionated schedules for recent clinical trials of radio-immunotherapy [17].

So far, only a few published mathematical models have focused on the equilibrium between the immune-stimulation and the immune-suppression induced by radiation [5], [9]. To our knowledge, no model explores specifically the relationship between fractionation and abscopal effect.

The biological assumptions underlying the IED model are partly like those previously published in [9] by our team, which covered specific immune checkpoint blockers (such as anti-PD1 and anti-CTLA4); however, the present model focuses on the *intrinsic* part of immunogenicity, i.e. the part coming only from the radiotherapy schedule.

Other contributing factors to the abscopal response certainly exist: type of immunotherapy, relative scheduling, general state of immunosuppression of the patient, tumor size, local state of immunosuppression within the tumor microenvironment, possibly locations of irradiated site and abscopal target [10], p53 somatic mutations [13], etc. These factors should also be considered as part of a larger multivariate analysis, while the independent predictive value of the dosing regimen could be described by the IED.

RESULTS

The IED model is compared to pre-clinical experiments of out-of-field responses for radiotherapy schedules used in metastatic breast cancer, as described by Dewan & al in [8].

The importance of interfraction interval on the intrinsic immunogenicity of radiotherapy schedules is

shown on a simple theoretical example with two equal doses.

Last, values of intrinsic immunogenicity are computed for three radiotherapy schedules: the classic normofractionated schedule and two so-called “hybrid” schedules.

IED is related to abscopal response (whereas BED or EQD2 are not)

In [8], Dewan & al. have injected TSA mouse breast carcinoma into syngeneic mice at two different sites. They irradiated one of the site with either 8 Gy x 3 fractions or 6 Gy x 5 fractions once daily, with and without an anti-CTLA4 antibody and they have measured the growth of the (non-irradiated) secondary site.

With combined anti-CTLA4 treatment, the average delays in growth with respect to control were: 6 days for 6 Gy x 5 fractions, 10 days for 8 Gy x 3 fractions. Hence, while these two schedules had almost identical BED and EQD2 (the definition of EQD2 is given below), the average growth delay of the 3 x 8 Gy schedule was 166% of that of the 5 x 6 Gy schedule. Since these two schedules have almost identical EQD2 and BED, the difference in the average out-of-field response, if it is not caused by randomness, can't be explained by classic radiobiology models alone.

Interestingly, the IED Efficacy of 3 x 8 Gy is *more than twice the IED Efficacy of the 5 x 6 Gy*: apparently, it seems strongly associated with the intensity of the out-of-field response. Numerical values are shown in Table 1.

Remark 1: this association persists when using a more radiosensitive tumour with $\alpha = 0.35$ or with varying values of α / β , or with different values of T_D (2 days, 3 days, 5 days) and T_{IR} (5 days, 7 days, 10 days). This can be verified with the online IED calculator: www.smartcalculators.online/ied.

Remark 2: the definition of EQD2 is standard, i.e. it is the total dose in Gy, that would produce the same cell kill as the schedule of interest, if it was administered in 2 Gy fractions (assuming a linear-quadratic model for cell kill).

Impact of the interfraction time on IED Efficacy

The interfraction time is a key factor for the local availability of intra-tumour immune effectors; with the IED model, this availability is increased either with a short inter-fraction time ($< T_D$) or with long inter-fraction time ($> T_D + T_{IR}$), but this availability is sharply decreased for intermediary inter-fraction values. This is illustrated on Figure 1 where two equal doses of 2 Gy are given with varying time interval, from 6 hours to 21 days. For the second radiation dose to not kill the immune effectors recruited by the necrotic tumour cells from the first radiation dose, the second radiation dose must be

Table 1: IED efficacy, other dosing metrics and experimental correlates for results in [8].

RT schedule	α	α / β	EQD2 (Gy)	BED (Gy)	IED efficacy	out-of-field growth delay (days)
3 × 8 Gy (J1-J2-J3)	0.15	4	48	72	74%	10
5 × 6 Gy (J1 to J5)	0.15	4	50	75	32%	6

administered either very early (before necrosis) or very late (after completion of most of the immune stimulation). This has practical consequences if one wants to design more immunogenic radiotherapy schedules, as shown in the next section.

IED Efficacy of various radiotherapy schedules

To demonstrate how the IED Efficacy indicator might be used, three schedules are provided: a classic normo-fractionated schedule in 2 Gy per fraction over 5 weeks that serves as a reference, and two new schedules, which are hybrid between normofractionated, split-course, and bi-fractionated (Figure 2). Despite the use of one break (10 and 13 days), the new schedules extend over the same total duration (32 days); they also have similar EQD2 and BED. Hence these new schedules should have similar tumor control probability and identical repopulation risk. The doses per fraction are also either identical (2 Gy) or slightly above (3 Gy) but then, only for a limited period (48h). The use of bi-fractionation is proposed to make up for the time lost during the break, but just for a minimum

period and the last two weeks are administered in normo-fractionated fashion.

The IED model predicts a low intrinsic immunogenicity for the normo-fractionated schedule (IED Efficacy: 2%), and greater values for the two hybrid schedules (28% and 67%). These values can be obtained by using the online calculator at www.smartcalculators.online/ied.

DISCUSSION

The clear positive relationship between IED Efficacy and the intensity of the out-of-field response observed with the data published in [8] is a strength of the model, but this needs to be confirmed on more experimental data.

The model prediction that normofractionated schedules should have lower immunogenicity than shorter schedules with higher doses per fraction seems coherent with some pre-clinical data [7], [8]. However, since out-of-field effects have also been described with normofractionated schedules [14], [15] more investigation

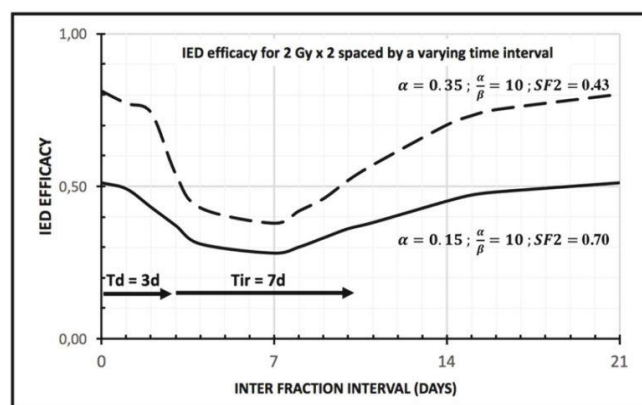


Figure 1: IED efficacy (between 0 and 100%) for two equal doses of 2 Gy, given with varying interfraction time (from 6h to 21 days); dashed line: highly radiosensitive tumour (Surviving Fraction 2 Gy = 0.43); solid line : intermediate radiosensitive tumour (Surviving Fraction 2 Gy = 0.70) ; the IED efficacy drops markedly if interfraction time $T > T_d$; the IED efficacy recovers most of its value if the interfraction time $T > T_d + T_{IR}$; the general shape is a steep drop in IED efficacy followed by a shallower recovery; notice how the impact of interfraction time decreases with radio resistance: strongly radio-resistant tumours should be less sensitive to the choice of the interfraction time.

is needed to clarify if this translates into a significant reduction of out-of-field responses.

The impact of interfraction time is consistent with pre-clinical data that have explored the dynamics of immune-infiltration in the tumor micro-environment after irradiation, such as Frey & al. [12]: with a peak of immune infiltration between 4 to 8 days after irradiation, radiation doses administered around that time range could be detrimental to anti-tumour immune response: this is indeed described by the IED model. Along a similar line, Formenti & al. [1] consider that the *local* availability of immune effectors inside the tumor micro-environment should be the main driver of anti-tumour immunity for immuno-radiotherapy, which is an idea at the core of the mechanistic approach of this model.

The IED model uses only two new “time” parameters T_D and T_{IR} , whose signification is clear, since they control the speed of post-radiotherapy necrosis (T_D) and the speed of immune infiltration (T_{IR}) within the TME. Furthermore, thanks to a free access through an online calculator, there is no need to understand the fine details of the formula or to use a mathematical software.

The choice $T_D = 3$ days is subject to caution, even though its order of magnitude is in line with some pre-clinical experiments [16], but this needs to be further explored: one could investigate whether T_D could be also dose- or tumour-dependent or if, and when, T_D might differ from 3 days by a large amount.

For example, if the death of tumor cell was strongly delayed after irradiation (= very high T_D), to such an extent that most of tumor death would occur long after the completion of the irradiation schedule, then the timing of radiation doses would not have any impact on immunogenicity (because all integrals θ_{ij} would be zero for $j < N$, and all θ_{iN} would be one; hence, the matrix Θ would be constant). It would be interesting to explore the potential circumstances under which this case might occur.

The two examples of new “hybrid” schedules that might be more immunogenic than the classic normofractionated schedule are hypothesis-generating. These examples have been provided to show some potential directions for future research, while on the short term, more model validation is necessary.

Obviously, the differences in immunogenicity reflect the hypothesis on the model parameters, especially on T_D (and to a lesser extent on T_{IR}): as discussed, larger values of T_D would reduce these differences.

The model proposes several hypotheses that could be experimentally challenged, for example:

- immunogenicity is not (only) about the dose per fraction, since large changes in theoretical immunogenicity could be obtained with identical dose per fraction, by “stacking” doses over shorter periods;
- the role of the interfraction time (which is inexistent in the classic linear-quadratic model) seems important for the local availability of immune effectors; however, this effect could be more important towards the start of the irradiation schedule (when live tumor mass is large) rather than towards its end (when live tumor mass should be much smaller);
- it follows that the total duration of the radiotherapy schedule does not have to be increased to improve immunogenicity, in contrast with the traditional split-course schedules which used to extend the total duration; this property is interesting since it avoids an increase in repopulation risk that could result from treatment extension;

The validity of the IED model for doses per fraction greater than 10 Gy is questionable: first, it relies on a linear-quadratic model whose validity above 10 Gy is not firmly established; second and more importantly, some pre-clinical data ([7], [8]) show that for very large doses per fraction (> 15 Gy), the IED model presented here would vastly

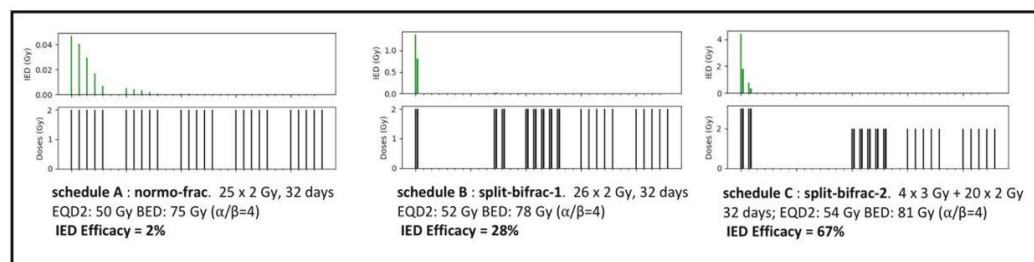


Figure 2: IED efficacy for three schedules: (A) normofractionated schedule (50 Gy in 25 fractions) very low IED Efficacy = 2%, (B) split-bifrac-1; proposal of new schedule that starts with one short bifractionation (2+2) for one day, split with 10-day break, 9 days of bi-fractionation (2+2) then 2 weeks of normofractionated, with same duration than A, same repopulation risk, EQD2 and BED than A, higher IED Efficacy = 28%; (C) split-bifrac-2 proposal of new schedule, starting with one short bifractionation (3+3) over 2 days, split with 13-day break, one week bifractionation (2+2), two weeks normofractionated, same duration than A, same repopulation risk, slightly higher EQD2 and BED than A, but much higher IED Efficacy = 67%.

overstate immunogenicity. However, an ad-hoc downward adjustment in the IED formula may provide a good correlate with [7], [8], even for > 10 Gy; this optional adjustment is available in the online calculator.

Finally, it is undeniable that predicting abscopal response is a difficult task, since it should depend on many parameters that may be patient-, organ-, tumour- or immunotherapy-specific. The IED model should not be misinterpreted as a tentative to replace this multi-

dimensional problem by the computation of just one indicator. To give an obvious example, the radiotherapist understands that irradiating a 20g-tumour volume should produce more immune stimulation than the irradiation of a 2g-tumour, all other things being equal. A long list of other confounding factors could be made, whose influence is not in the scope of the proposed model, such as the immune status of the underlying tumor micro-environment ("hot" vs "cold" environment), the intrinsic efficacy of the

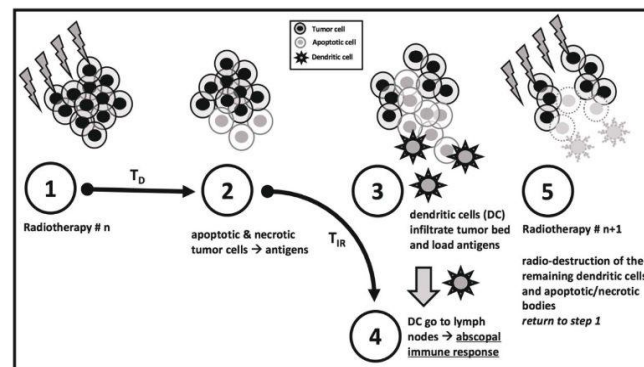


Figure 3: The 5-step dynamics of IED model. Simplified graphical description. The actual model relies on a continuous process rather than a discrete step-by-step dynamic. T_D : Time to Death (days) T_{IR} : Time to Immune Response (days).

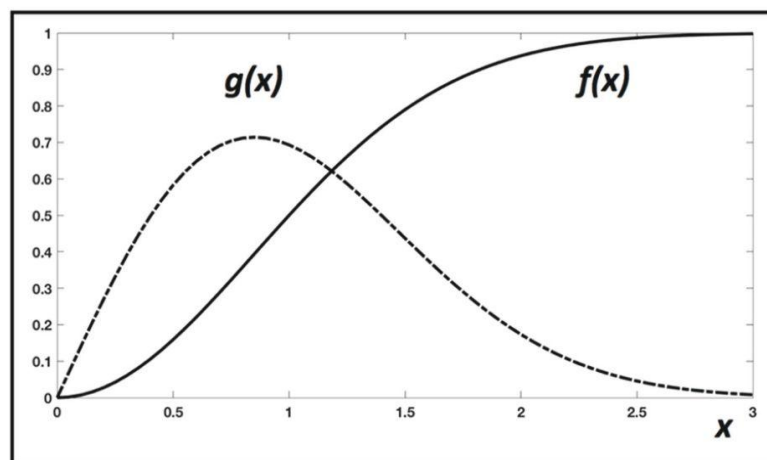


Figure 4: Graphical description of the two functions used in the IED model. The number $g(x)$ describes the gradual release of tumour antigens at time x , after irradiation at $x = 0$. The number $f(x)$ describes the gradual immune stimulation, after tumour antigen release at $x = 0$. Here, x can be understood as a unit-less time variable, that is replaced by the ratio of an elapsed time over T_D (for g), or elapsed time over T_{IR} (for f). Their definitions are: $f(x) = 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^{x^2}$ and $g(x) = f(x) = 2 \ln(2) \cdot x \left(\frac{1}{2}\right)^{x^2}$, but other expressions could be used without changing the behaviour of the model, if the general shape of these curves is like this example.

concomitant immunotherapy, etc. Some of these factors might be added as covariates in the model, especially the state of the tumor micro-environment that could be described with the value of the time parameter T_{IR} : colder (*resp.* hotter) environment could be associated with higher (*resp.* smaller) values of T_{IR} .

But even in its simplest form with fixed parameters and no covariate, the IED formula provides a quick rule-of-thumb to assess the relevance of fractionation (from the standpoint of immunogenicity) and, on occasion, avoid the choice of under-performing schedules.

MATERIALS AND METHODS

Description of IED model

In the model, the radiotherapy-mediated anti-tumour immune response is proportional to the fraction of tumour cells killed by irradiation, whose content has been processed by immune effectors before the next irradiation. Hence, depending on the interfraction time, the number of killed tumour cells that contribute to the immune response may be significantly smaller than the total cell kill predicted by the BED.

More precisely, each radiation dose kills a certain number of cells, with a surviving fraction described by the two parameters (α , β) of a classic linear-quadratic model [11]. Then, lethally wounded cells die in a gradual process and produce tumour antigens in the tumor micro environment.

The time parameter T_D controls the speed of this antigen release: 50% of the tumour antigens are released after a time T_D (step 1 and 2 in Figure 3). Then, dendritic cells (DC) and other Antigen Presenting Cells (APC) take on tumour antigens and present them to lymphocytes in the draining lymph nodes. All numerical results were obtained with $T_D = 3$ days (in coherence with data in [16], more details in the Discussion), while other T_D values could obviously be considered.

The time parameter T_{IR} (Time to Immune Response) controls the speed of this second process: 50% of completion is attained after a time T_{IR} , following tumour antigen release (step 3 and 4 in Figure 1). Finally, the next radiation dose kills (or cause the dysfunction of) all immune effectors in the tumor micro-environment (step 5 in Figure 1). All numerical results here are obtained with $T_{IR} = 7$ days, a reasonable estimate for such an immunologic phenomenon.

In summary, the model describes a succession of a progressive immuno-stimulation by dying tumour cells followed by an instantaneous immuno-suppression caused by the next irradiation.

For a *unique* dose, under the above assumptions, *all* killed tumour cells should contribute to the immune response. Hence, by defining IED as a unique dose given

at infinitely low-dose rate, the IED value is obtained by solving the equation where the proportion of tumour cells that would be killed by this virtual dose, which is $1 - e^{-\alpha \text{ IED}}$, equals the proportion of tumour cells that have contributed to the immune response as described above.

The direct solving of this equation yields a unique IED for any radiotherapy schedule, which is only defined by the dosing schedule and the choice of the radio-sensitivity parameters (α , β) and of the parameters that controls the immune response dynamics (T_D , T_{IR}). The IED is interpreted as a measure of the *intrinsic* contribution of the dosing schedule to immunogenicity.

The value $E = 1 - e^{-\alpha \text{ IED}}$ (a positive number < 1) is introduced to reflect better the efficacy of the radiotherapy schedule: 1 means maximal efficacy (100% of tumour volume contributed to immune response) and 0 means no immune efficacy (no volume contributed to immune response). This **E** value is named **IED Efficacy**.

Mathematics of IED model

This section may be skipped by non-mathematicians. Using directly the model is possible by using the free web-based calculator, at www.smartcalculators.online/ied.

With the above assumptions, for N equal radiation doses of D Gy given at times $T_1, T_2, \dots, T_N$, the vector **E** of the quantities of “immunogenic” tumour antigens produced by each dose is equal to:

$$\mathbf{E} = \mathbf{S} \Theta \mathbf{K}$$

where:

- S** is an N -by- N diagonal matrix with $S_{ii} = (1 - k_D)^{i-1}$, the fraction of surviving tumour cells available just before the i^{th} radiation dose, where $k_D = 1 - e^{-\alpha D - \beta D^2}$, is the killed fraction for dose D ;

- Θ is an N by N matrix where: $\theta_{ij} = 0$ for $j < i$, or $\theta_{ij} = \int_{T_j}^{T_{j+1}} g\left(\frac{t - T_i}{T_D}\right) f\left(\frac{T_{j+1} - t}{T_{IR}}\right) dt$ for $j \geq i$; the functions f and g are detailed in Figure 4;

- K** is a N -by-1 vector whose components are equal to k_D ;

For example, with $N = 3$ doses, $\mathbf{E} = \mathbf{S} \Theta \mathbf{K}$ is:

$$\begin{bmatrix} E_1 \\ E_2 \\ E_3 \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 - k_D & 0 \\ 0 & 0 & (1 - k_D)^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \theta_{11} & \theta_{12} & \theta_{13} \\ 0 & \theta_{22} & \theta_{23} \\ 0 & 0 & \theta_{33} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} k_D \\ k_D \\ k_D \end{bmatrix}$$

Finally, IED is obtained by solving $E_1 + \dots + E_N = 1 - e^{-\alpha \text{ IED}}$.

The sum of the components of **E** is named **IED Efficacy**; it represents the % of tumor volume that is converted into “immunogenic” antigens, hence it is easier to interpret than the crude IED number.

The θ_{ij} coefficients are computed numerically (for $j = N$, the upper bound of the integral should be set to $+\infty$).

The integral θ_{ij} represents the fraction of immunogenic antigens produced by tumour cells killed by the i^{th} radiation at time T_i but released later between the times T_j and T_{j+1} ; $g(x)$ is the rate of release of tumour antigens per unit of time, after one irradiation (at $x = 0$); $f(x)$ is the completion rate of the immune activation triggered by the release (at $x = 0$) of tumour antigens, hence it is a positive number smaller than one. The parameters T_D and T_{IR} control the speed of each phenomenon.

Hence, the matrix Θ depends only on the *timing* of radiation doses and on the time parameters (T_D , T_{IR}), whereas the vector K and the matrix S depend upon the *size* of the dose per fraction and the radio-sensitivity parameters (α , β).

From $E = S \Theta K$, it is obvious that initial radiation doses contribute to the most part of immunogenic tumour antigens, because of the geometric decrease of the components of S .

CONCLUSIONS

The Immunologically Effective Dose (IED) model complements the classic linear-quadratic formula by considering the dynamics of the immune infiltration within the tumor micro-environment. Then, it produces forecasts about the impacts of various radiotherapy schedules on the anti-tumor immune response.

Understanding the result of the IED model is easy with the IED Efficacy, which is the percentage of tumour volume that gives “immunogenic” tumour antigens: the closest to one, the better.

Obtaining the IED Efficacy of any radiotherapy schedule can be done with an online calculator that is freely available at www.smartcalculators.online/ied. Two parameters are needed: T_D and T_{IR} , in addition to the classic parameters (α , β) of the linear-quadratic model.

It is not recommended to use the model with doses per fraction above 10 Gy, however, an ad-hoc adjustment parameter may be used if necessary.

With the IED algorithm, new radiotherapy schedules could be investigated in-silico, before being confirmed by preclinical data or clinical trials.

However, the validation of the model on more pre-clinical or clinical data is the next major step.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported as part of the SMART Project by a grant from the A*Midex foundation (Aix Marseille Univ, Marseille France) and the Investissement d'Avenir national program.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *The Lancet Oncology*. 2009; 10: 718–26. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70082-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70082-8).
- Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, Mu Z, Rasalan T, Adamow M, Ritter E, Sedrak C, Jungbluth AA, Chua R, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2012; 366: 925–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112824>.
- Golden EB, Demaria S, Schiff PB, Chachoua A, Formenti SC. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology Research*. 2013; 1: 365–72. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0115>.
- Deloch L, Derer A, Hartmann J, Frey B, Fietkau R, Gaipl US. Modern radiotherapy concepts and the impact of radiation on immune activation. *Frontiers in Oncology*. 2016; 6: 141. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00141>.
- Yovino S, Kleinberg L, Grossman SA, Narayanan M, Ford E. The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells. *Cancer Investigation*. 2013; 31: 140–4. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.762780>.
- Merrick A, Errington F, Milward K, O'Donnell D, Harrington K, Bateman A, Pandha H, Vile R, Morrison E, Selby P, Melcher A. Immunosuppressive effects of radiation on human dendritic cells: reduced IL-12 production on activation and impairment of naive T-cell priming. *British Journal of Cancer*. 2005; 92: 1450. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602518>.
- Schaue D, Ratikan JA, Iwamoto KS, McBride WH. Maximizing tumor immunity with fractionated radiation. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2012; 83: 1306–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.049>.
- Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngeart JK, Babb JS, Formenti SC, Demaria S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15: 5379–88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0265>.
- Serre R, Benzekry S, Padovani L, Meille C, Andre N, Ciccolini J, Barlesi F, Muracciole X, Barbolosi D. Mathematical modeling of cancer immunotherapy and its synergy with radiotherapy. *Cancer Research*. 2016; 76: 4931–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3567>.

10. Poleszczuk JT, Luddy KA, Prokopiou S, Robertson-Tessi M, Moros EG, Fishman M, Djeu JY, Finkelstein SE, Enderling H. Abscopal benefits of localized radiotherapy depend on activated T-cell trafficking and distribution between metastatic lesions. *Cancer Research*. 2016; 76: 1009–18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1423>.
11. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *The British Journal of Radiology*. 1989; 62: 679–94. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-62-740-679>.
12. Frey B, Rückert M, Weber J, Mayr X, Derer A, Lotter M, Bert C, Rödel F, Fietkau R, Gaipl US. Hypofractionated Irradiation Has Immune Stimulatory Potential and Induces a Timely Restricted Infiltration of Immune Cells in Colon Cancer Tumors. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00231>.
13. Camphausen K, Moses MA, Ménard C, Sproull M, Beecken WD, Folkman J, O'Reilly MS. Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53. *Cancer Res*. 2003; 63: 1990–3.
14. Grimaldi AM, Simeone E, Giannarelli D, Muto P, Falivene S, Borzillo V, Giugliano FM, Sandomenico F, Petrillo A, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, et al. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014; 3: e28780. <https://doi.org/10.4161/onci.28780>.
15. Chandra RA, Wilhite TJ, Balboni TA, Alexander BM, Spektor A, Ott PA, Ng AK, Hodi FS, Schoenfeld JD. A systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2015; 4: e1046028. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1046028>.
16. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology. 2004.
17. Kang J, Demaria S, Formenti S. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2016; 4. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0156-7>.

Conclusion

L'actualité des essais cliniques nous rappelle que la recherche de combinaisons efficace est nécessaire pour augmenter les taux de réponse aux immunothérapies: selon les molécules et les tumeurs, les taux de réponse des inhibiteurs de checkpoint en monothérapie oscillent autour de 20%, tandis que certaines combinaisons permettent parfois de doubler ce taux.

La radiothérapie a un rôle particulier à jouer dans ces stratégies de combinaison car elle peut avoir une action ablatrice, sans les effets immunosuppresseurs des chimiothérapies ni la trop grande sélectivité des thérapies ciblées, tandis que le relargage important des néo antigènes tumoraux pourrait potentialiser la réponse immunitaire anti-tumorale. Si ces notions se diffusent de plus en plus dans la communauté des oncologues-radiothérapeutes et même au-delà, grâce aux travaux pionniers de certaines équipes et à l'engagement personnel de chercheurs influents, à ce stade relativement peu a été accompli pour clarifier les fractionnements et les séquencements optimaux pour l'immuno-radiothérapie. Comme il l'a été rappelé lors de la session de la SFRO du 6-8 octobre 2021, même si des données cliniques encourageantes commencent à être disponibles, les modalités pratiques restent à définir: fractionnement des doses, volumes d'irradiations, séquençement néoadjuvant, séquentiel ou adjuvant...sont des questions toujours non résolues. Les dernières données cliniques tendent à complexifier le tableau: les toxicités de l'immuno-radiothérapie se dévoilent, elles pourraient être parfois limitantes.

Conscients de ces problèmes, nous avons essayé d'apporter une contribution du point de vue théorique en cherchant des modèles mathématiques permettant d'optimiser numériquement des schémas d'immuno-radiothérapie. Vers 2015, nous pensions qu'en l'absence de modélisation mathématique, il serait difficile de progresser sur le long terme. En effet, si la radiobiologie s'est constituée sur des décennies et s'est appuyée (initialement et par nécessité) sur l'empirisme, il fut nécessaire de formuler précisément des concepts (tels les fameux 4-Rs de la radiobiologie) et afin de progresser, d'imaginer des modèles mathématiques, dont certains sont couramment utilisés aujourd'hui, comme le modèle linéaire-quadratique. Ajouter l'immunologie dans la radiobiologie nécessite donc un travail d'intégration de certaines notions d'immunologie dans la modélisation de la radiobiologie, la difficulté étant dans le choix

des éléments nécessaires et suffisants à intégrer. En 2021, si l'approche empirique de l'immuno-radiothérapie a permis de démontrer la faisabilité, d'obtenir des données de toxicité et de montrer des résultats encourageants et parfois mitigés, beaucoup de chemin reste à accomplir et l'immuno-radiothérapie n'a pas encore fait la preuve formelle de son utilité parmi les autres options de combinaison avec l'immunothérapie (que sont les chimiothérapies, les thérapies ciblées, ou les combinaisons de plusieurs immunothérapies). Par ailleurs, il semble que le véritable potentiel de synergie entre la radiothérapie et l'immunothérapie n'a pas encore été complètement libéré par les modalités expérimentées, qui ne surclassent pas les taux de réponse obtenus en combinaison avec d'autres thérapeutiques. Progresser au niveau théorique nous semble un pré-requis pour dépasser ces limites sur le long terme.

Dans ce travail de recherche, nous avons initialement décrit la synergie entre radiothérapie et immunothérapie grâce à un modèle d'inspiration globalement mécanistique, comportant cependant une représentation abstraite et simplifiée (phénoménologique) du système immunitaire. Ce premier modèle est relativement complexe de mise en œuvre, car très paramétré. Si l'on se replace dans le contexte de l'année de sa publication (2016), il n'existait alors aucun modèle sur ce sujet et il était impossible de se baser sur un modèle existant pour le simplifier et en tirer un outil pratique. Il était également difficile de proposer directement un modèle simplifié ne s'intéressant, comme le second modèle, qu'à la dynamique des effecteurs immunitaires en relation avec le fractionnement. De plus, ce premier modèle, grâce à son côté mécanistique, permet une grande flexibilité dans les simulations et génère des hypothèses sur le timing du séquençage entre radiothérapie et immunothérapie ou sur l'intrication entre la taille tumorale et l'efficacité thérapeutique. Ainsi il suggère l'existence d'une fenêtre d'opportunité avec des implications pratiques, comme l'existence d'un nombre minimal de lésions à irradier ou l'hypothèse de l'utilité du debulking pour resensibiliser aux immunothérapies, qui sont actuellement testées dans des essais cliniques. Il insiste également sur l'importance de la concomitance entre radiothérapie et immunothérapie et permet de discuter des compromis à trouver entre la pharmacocinétique des immunothérapies et la cinétique propre de la tumeur. Cependant, comme nombre de modèles complexes et mécanistiques, ces conclusions sont plus volontiers *qualitatives* que quantitatives: elles ouvrent des pistes à explorer

par des essais cliniques et à analyser par des outils plus simples (comme des statistiques descriptives ou des modèles PK-PD).

Ce premier modèle a permis de tester la qualité du système dynamique tumeur-antigènes-effecteurs, qui s'est montrée utile, en dépit de sa simplicité. Aussi avons-nous conservé ce triptyque pour développer un deuxième modèle visant à explorer spécifiquement la question du fractionnement pour l'immuno-radiothérapie. En raison de la versatilité des immunothérapies, nous avons modélisé une immunogénicité *intrinsèque* à un fractionnement de radiothérapie, c'est-à-dire, sa capacité à produire des néo antigènes tumoraux puis à les faire traiter par le système immunitaire. Nous avons enlevé des équations les particularités liées aux immunothérapies, afin de produire des résultats valables que ce soit pour des checkpoint inhibiteurs, des CAR T cells, ou même des cytokines. La question de quelle immunothérapie à combiner pour une tumeur en particulier est laissée aux spécialistes (immunologistes ou oncologues médicaux) tandis que l'oncologue-radiothérapeute peut se concentrer sur le *meilleur fractionnement possible*.

Cette immunogénicité intrinsèque repose sur la dose totale et la dose par fraction, mais aussi sur le choix des intervalles entre les fractions, qui régulent la disponibilité des effecteurs immunitaires au sein du micro environnement tumoral, par l'intermédiaire de leur cytotoxicité sur l'ensemble des cellules. Ce modèle calcule ainsi une *dose immunologique efficace*, qui peut s'exprimer, au choix, comme une dose ionisante en gray ou comme un pourcentage sans unité, nommé *efficacité immunologique*. A ce stade, on constate une bonne association entre cette *dose immunologique efficace*, ou son équivalent l'*efficacité immunologique*, et le taux de réponse à l'immuno-radiothérapie dans des données expérimentales mais aussi des données cliniques récemment publiées. Cette *dose immunologique efficace* pourrait un jour venir compléter les notions classiques de *dose biologique efficace* (BED) et autres équivalents de dose familiers de la radiothérapie classique. Mais avant cela, des validations sur des données cliniques supplémentaires seront bien sûr nécessaires.

La complexité du modèle de la *dose immunologique efficace* est réduite, puisque seulement deux paramètres de cinétique sont nécessaires, les autres paramètres étant ceux du modèle linéaire quadratique. Le premier paramètre décrit la cinétique de la mort cellulaire tumorale après irradiation tandis que le deuxième décrit la cinétique de l'infiltration immunitaire. On connaît des estimations raisonnables de ces paramètres

dans des conditions expérimentales; il est possible que des méthodes de préférence *non* invasives (d'imagerie, des biomarqueurs) puissent affiner leur connaissance en clinique.

Qualitativement, ce modèle permet de dégager des règles permettant de construire des fractionnements à la fois *ablatifs* (par leur dose cumulée) et *immunogènes* (par le choix approprié des doses par fraction et des intervalles libres): regroupement de doses en *clusters*, respect d'intervalles inter-fractions suffisamment longs, possibilité de normo fractionner sans impact négatif sur l'immunogénicité au delà d'une certaine dose cumulée.

Nous soutenons qu'il faut essayer de conserver à la radiothérapie son caractère *ablatif*, même en combinaison avec l'immunothérapie, pour plusieurs raisons: l'efficacité de l'immunothérapie peut décroître avec la taille tumorale, certains clones peuvent être immuno-résistants, l'échappement immunitaire n'est qu'un pilier parmi d'autres de la cancérogenèse, et il n'est pas certain qu'une radiothérapie non-ablative présente un intérêt par rapport à des (poly-) chimiothérapies ou des thérapies ciblées. Ces considérations seront bien sûr à adapter en fonction des toxicités auto-immunes: les doses sous-ablatives ou même les basses doses pourraient dans ce cas constituer des options pour des patients bien sélectionnés, à risque élevé de toxicité auto-immune grave.

Quantitativement, malgré une complexité supplémentaire par rapport au modèle linéaire quadratique lié à ses 2 paramètres supplémentaires, le calcul du modèle est simple grâce à un calculateur accessible en ligne.

Si le modèle de la *dose immunologique efficace* semble une solution théorique à la question du fractionnement, d'autres questions importantes ne sont pas encore adressées par la modélisation, comme les toxicités de l'immuno-radiothérapie, le choix des volumes d'irradiation et en particulier la place du traitement prophylactique des aires ganglionnaires (et si l'on dépasse le cadre de la radiothérapie, la place des curages ganglionnaires de stadification).

Un regain d'intérêt pour les basses doses de radiothérapie à visée d'immuno stimulation se manifeste actuellement, à ces niveaux de dose les hypothèses de la dose immunologique efficace, dans sa formulation actuelle, ne sont pas valides et il faudrait adapter le calcul.

Concernant les toxicités de l'immuno-radiothérapie, les données sont encore trop parcellaires et elles devraient être abordées en priorité sous l'angle des histogrammes

doses-volumes: il est encore trop tôt pour juger de la pertinence ou de l'éventuelle obsolescence, de ce formalisme éprouvé.

Au début de ce manuscrit, nous avons rappelé les différents piliers de la cancérogenèse. Si l'échappement immunitaire est l'un d'entre eux, il ne constitue pas le moteur principal de toutes les tumeurs. Il est donc utile de continuer la recherche sur l'immuno-radiothérapie mais aussi sur d'autres combinaisons adressant d'autres piliers, comme par exemple la reprogrammation métabolique tumorale, un autre facteur limitant de la réponse immunitaire, qui pourrait jouer un rôle synergique avec l'immunothérapie et la radiothérapie (145).

Références bibliographiques

1. Jin J-Y, Mereniuk T, Yalamanchali A, Wang W, Machtay M, (Spring)Kong F-M, et al. A framework for modeling radiation induced lymphopenia in radiotherapy. *Radiother Oncol.* mars 2020;144:105-13.
2. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol.* août 1989;62(740):679-94.
3. Meille C, Barbolosi D, Ciccolini J, Freyer G, Iliadis A. Revisiting Dosing Regimen Using Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Mathematical Modeling: Densification and Intensification of Combination Cancer Therapy. *Clin Pharmacokinet.* août 2016;55(8):1015-25.
4. Hénin E, Meille C, Barbolosi D, You B, Guitton J, Iliadis A, et al. Revisiting dosing regimen using PK/PD modeling: the MODEL1 phase I/II trial of docetaxel plus epirubicin in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* avr 2016;156(2):331-41.
5. Meille C, Guerreiro N, Jullion A, Bauer S, Chatterjee M, Vos F de, et al. Abstract CT154: Optimization of the dose and schedule of an HDM2 inhibitor NVP-HDM201 in a first-in-human Phase I study using a mechanism-based PK/PD model. In: *Clinical Trials [Internet]. American Association for Cancer Research; 2017 [cité 23 août 2021].* p. CT154-CT154. Disponible sur: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2017-CT154>
6. Ward MC, Vicini F, Chadha M, Pierce L, Recht A, Hayman J, et al. Radiation Therapy Without Hormone Therapy for Women Age 70 or Above with Low-Risk Early Breast Cancer: A Microsimulation. *Int J Radiat Oncol.* oct 2019;105(2):296-306.
7. Hannoun-Levi J-M, Chamorey E, Boulahssass R, Polgar C, Strnad V. Endocrine therapy with accelerated Partial breast irradiatiOn or exclusive ultra-accelerated Partial breast irradiation for women aged ≥ 60 years with Early-stage breast cancer (EPOPE): The rationale for a GEC-ESTRO randomized phase III-controlled trial. *Clin Transl Radiat Oncol.* juill 2021;29:1-8.
8. Sun R, Limkin EJ, Vakalopoulou M, Dercle L, Champiat S, Han SR, et al. A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study. *Lancet Oncol.* sept 2018;19(9):1180-91.
9. Hartenstein A, Lübke F, Baur ADJ, Rudolph MM, Furth C, Brenner W, et al. Prostate Cancer Nodal Staging: Using Deep Learning to Predict 68Ga-PSMA-Positivity from CT Imaging Alone. *Sci Rep.* déc 2020;10(1):3398.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell.* 2011;144(5):646-74.
11. ICGC Prostate UK Group, Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* avr 2015;520(7547):353-7.
12. Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, Nakashiro K, Hamakawa H. Detection of lymph node micrometastases in patients with squamous carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* oct 2008;265(10):1147-53.
13. Zhao P. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. 2019;14.
14. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 19 déc 2002;420(6917):860-7.
15. Korniluk A, Koper O, Kemona H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer.

- Ir J Med Sci. févr 2017;186(1):57-62.
16. Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Tulipan J, Catalano L, Feichtinger RG, Kofler B. Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand? *Mol Metab.* mars 2020;33:102-21.
 17. Papillon J. Present status of radiation therapy in the conservative management of rectal cancer. *Radiother Oncol.* avr 1990;17(4):275-83.
 18. Dhadda AS, Martin A, Killeen S, Hunter IA. Organ Preservation Using Contact Radiotherapy for Early Rectal Cancer: Outcomes of Patients Treated at a Single Centre in the UK. *Clin Oncol.* mars 2017;29(3):198-204.
 19. Joiner MC, Johns H. Renal Damage in the Mouse: The Response to Very Small Doses per Fraction. *Radiat Res.* mai 1988;114(2):385.
 20. Murray Brunt A, Haviland JS, Wheatley DA, Sydenham MA, Alhasso A, Bloomfield DJ, et al. Hypofractionated breast radiotherapy for 1 week versus 3 weeks (FAST-Forward): 5-year efficacy and late normal tissue effects results from a multicentre, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *The Lancet.* mai 2020;395(10237):1613-26.
 21. Ling CC, Gerweck LE, Zaider M, Yorke E. Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiother Oncol.* juin 2010;95(3):261-8.
 22. Wang JZ, Mayr NA, Yuh WTC. A Generalized Linear-Quadratic Formula for High-Dose-Rate Brachytherapy and Radiosurgery. *Int J Radiat Oncol.* nov 2007;69(3):S619-20.
 23. Fowler JF. Brief summary of radiobiological principles in fractionated radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* janv 1992;2(1):16-21.
 24. Eschwege F, Bourhis J, Girinski T, Lartigau E, Guichard M, Deblé D, et al. Predictive assays of radiation response in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a review of the Institute Gustave Roussy experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 nov 1997;39(4):849-53.
 25. Skladowski K, Law MG, Maciejewski B, Gordon Steel G. Planned and unplanned gaps in radiotherapy: the importance of gap position and gap duration. *Radiother Oncol.* févr 1994;30(2):109-20.
 26. Bourhis J, Burtneess B, Licitra LF, Nutting C, Schoenfeld JD, Ait Sarkouh R, et al. TrilynX: A phase 3 trial of xevinapant and concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 20 mai 2021;39(15_suppl):TPS6091-TPS6091.
 27. Fuks Z, Kolesnick R. Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell.* août 2005;8(2):89-91.
 28. Lesueur P, Lequesne J, Grellard J-M, Dugué A, Coquan E, Brachet P-E, et al. Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer.* déc 2019;19(1):198.
 29. Peeters STH, Heemsbergen WD, Koper PCM, van Putten WLJ, Slot A, Dielwart MFH, et al. Dose-Response in Radiotherapy for Localized Prostate Cancer: Results of the Dutch Multicenter Randomized Phase III Trial Comparing 68 Gy of Radiotherapy With 78 Gy. *J Clin Oncol.* 1 mai 2006;24(13):1990-6.
 30. Kannan null, Jain null. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol.* sept 2000;7(3):153-63.
 31. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* janv 2007;9(1):49-89.
 32. Rainaldi G, Ferrante A, Indovina PL, Santini MT. Induction of apoptosis or necrosis by

- ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res.* juin 2003;23(3B):2505-18.
33. Castle KD, Kirsch DG. Establishing the Impact of Vascular Damage on Tumor Response to High-Dose Radiation Therapy. *Cancer Res.* 15 nov 2019;79(22):5685-92.
 34. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* janv 2014;21(1):39-49.
 35. Stone HB, Peters LJ, Milas L. Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* nov 1979;63(5):1229-35.
 36. Vaage J. Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity. *Cancer Res.* mars 1973;33(3):493-503.
 37. Vaage J, Doroshow JH, DuBois TT. Radiation-induced Changes in Established Tumor Immunity'. 34:10.
 38. Oettgen HF. Immunotherapy of cancer. *N Engl J Med.* 1 sept 1977;297(9):484-91.
 39. Magnussen AL, Mills IG. Vascular normalisation as the stepping stone into tumour microenvironment transformation. *Br J Cancer.* 3 août 2021;125(3):324-36.
 40. Mondini M, Nizard M, Tran T, Mauge L, Loi M, Clémenson C, et al. Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Mol Cancer Ther.* juin 2015;14(6):1336-45.
 41. Tubiana M. Repopulation in Human Tumors: A Biological Back-Ground for Fractionation in Radiotherapy. *Acta Oncol.* janv 1988;27(2):83-8.
 42. Baumann M, Krause M, Thames H, Trott K, Zips D. Cancer stem cells and radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* janv 2009;85(5):391-402.
 43. Emami B, Lyman J, Brown A, Cola L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol.* mai 1991;21(1):109-22.
 44. Mornex F, Pavy JJ, Denekamp J, Bolla M. [Scoring system of late effects of radiations on normal tissues: the SOMA-LENT scale]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol.* 1997;1(6):622-68.
 45. McBride WH, Chiang C-S, Olson JL, Wang C-C, Hong J-H, Pajonk F, et al. A Sense of Danger from Radiation¹. *Radiat Res.* juill 2004;162(1):1-19.
 46. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 17 déc 2019;10:2965.
 47. Mehdipour A, Yousefi-Ahmadipour A, Kennedy D, Kazemi Arababadi M. Ionizing radiation and toll like receptors: A systematic review article. *Hum Immunol.* juin 2021;82(6):446-54.
 48. Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.* mai 2019;41(3):283-97.
 49. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4⁺ T Cells to T-Regulatory Cells. *Cancer Res.* :12.
 50. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature.* 23 janv 2020;577(7791):549-55.
 51. Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Semin Immunopathol.* mai 2019;41(3):301-14.
 52. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood.* 4 janv 2018;131(1):58-67.
 53. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E,

- et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 21 nov 2019;381(21):2020-31.
54. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity: PD-1 pathway, Tregs, and autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 15 juin 2010;236(1):219-42.
 55. Schoenfeld AJ, Antonia SJ, Awad MM, Felip E, Gainor J, Gettinger SN, et al. Clinical definition of acquired resistance to immunotherapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. sept 2021;S0923753421044550.
 56. König D, Läubli H. Mechanisms of Immune-Related Complications in Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Pharmacology*. 28 juill 2020;1-14.
 57. Berner F, Bomze D, Diem S, Ali OH, Fässler M, Ring S, et al. Association of Checkpoint Inhibitor-Induced Toxic Effects With Shared Cancer and Tissue Antigens in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 1 juill 2019;5(7):1043-7.
 58. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Homet B, Chodon T, et al. CTLA4 Blockade Broadens the Peripheral T-Cell Receptor Repertoire. *Clin Cancer Res*. 1 mai 2014;20(9):2424-32.
 59. Mizrahi M, Ilan Y. The gut mucosa as a site for induction of regulatory T-cells. *Curr Pharm Des*. 2009;15(11):1191-202.
 60. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 5 janv 2018;359(6371):104-8.
 61. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 5 janv 2018;359(6371):91-7.
 62. Wang Y, Wiesnoski DH, Helmink BA, Gopalakrishnan V, Choi K, DuPont HL, et al. Fecal microbiota transplantation for refractory immune checkpoint inhibitor-associated colitis. *Nat Med*. déc 2018;24(12):1804-8.
 63. Khan S, Gerber DE. Autoimmunity, checkpoint inhibitor therapy and immune-related adverse events: A review. *Semin Cancer Biol*. août 2020;64:93-101.
 64. Xu C, Chen Y-P, Du X-J, Liu J-Q, Huang C-L, Chen L, et al. Comparative safety of immune checkpoint inhibitors in cancer: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 8 nov 2018;363:k4226.
 65. Nishino M, Giobbie-Hurder A, Hatabu H, Ramaiya NH, Hodi FS. Incidence of Programmed Cell Death 1 Inhibitor-Related Pneumonitis in Patients With Advanced Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 1 déc 2016;2(12):1607.
 66. Matos I, Martin-Liberal J, García-Ruiz A, Hierro C, Ochoa de Olza M, Viaplana C, et al. Capturing Hyperprogressive Disease with Immune-Checkpoint Inhibitors Using RECIST 1.1 Criteria. *Clin Cancer Res*. 15 avr 2020;26(8):1846-55.
 67. Arasanz H, Zuazo M, Bocanegra A, Chocarro L, Blanco E, Martínez M, et al. Hyperprogressive Disease: Main Features and Key Controversies. *Int J Mol Sci*. 3 avr 2021;22(7):3736.
 68. Ai L, Chen J, Yan H, He Q, Luo P, Xu Z, et al. Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. *Drug Des Devel Ther*. sept 2020;Volume 14:3625-49.
 69. Cózar B, Greppi M, Carpentier S, Narni-Mancinelli E, Chiossone L, Vivier E. Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. *Cancer Discov*. janv 2021;11(1):34-44.
 70. Khan M, Arooj S, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front Immunol*. 13 févr 2020;11:167.

71. Osipov A, Saung MT, Zheng L, Murphy AG. Small molecule immunomodulation: the tumor microenvironment and overcoming immune escape. *J Immunother Cancer*. déc 2019;7(1):224.
72. Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, Gottschalk S. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 4 nov 2020;28(11):2320-39.
73. Larson RC, Maus MV. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer*. mars 2021;21(3):145-61.
74. Durante M, Formenti SC. Radiation-Induced Chromosomal Aberrations and Immunotherapy: Micronuclei, Cytosolic DNA, and Interferon-Production Pathway. *Front Oncol*. 29 mai 2018;8:192.
75. Formenti SC, Demaria S. Future of Radiation and Immunotherapy. *Int J Radiat Oncol*. sept 2020;108(1):3-5.
76. Galluzzi L, Vanpouille-Box C, Bakhoun SF, Demaria S. SnapShot: CGAS-STING Signaling. *Cell*. 22 mars 2018;173(1):276-276.e1.
77. Tsai M-H, Cook JA, Chandramouli GVR, DeGraff W, Yan H, Zhao S, et al. Gene Expression Profiling of Breast, Prostate, and Glioma Cells following Single versus Fractionated Doses of Radiation. *Cancer Res*. 15 avr 2007;67(8):3845-52.
78. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, et al. Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect when Combined with Anti-CTLA-4 Antibody. *Clin Cancer Res*. 1 sept 2009;15(17):5379-88.
79. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*. août 2017;8(1):15618.
80. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, et al. Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect when Combined with Anti-CTLA-4 Antibody. *Clin Cancer Res*. 1 sept 2009;15(17):5379-88.
81. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, K.Wansley E, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*. 15 mai 2006;203(5):1259-71.
82. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an iNOS⁺/M1 Phenotype that Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy. *Cancer Cell*. nov 2013;24(5):589-602.
83. Ungvari Z, Podlutzky A, Sosnowska D, Tucsek Z, Toth P, Deak F, et al. Ionizing Radiation Promotes the Acquisition of a Senescence-Associated Secretory Phenotype and Impairs Angiogenic Capacity in Cerebromicrovascular Endothelial Cells: Role of Increased DNA Damage and Decreased DNA Repair Capacity in Microvascular Radiosensitivity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1 déc 2013;68(12):1443-57.
84. Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, Robson T, Arrand JE, Skov KA, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. nov 1996;358(2):171-83.
85. Farooque A, Mathur R, Verma A, Kaul V, Bhatt AN, Adhikari JS, et al. Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement. *Expert Rev Anticancer Ther*. mai 2011;11(5):791-802.
86. Patel RR, He K, Barsoumian HB, Chang JY, Tang C, Verma V, et al. High-dose

- irradiation in combination with non-ablative low-dose radiation to treat metastatic disease after progression on immunotherapy: Results of a phase II trial. *Radiother Oncol.* sept 2021;162:60-7.
87. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol.* mars 2004;58(3):862-70.
 88. Mondini M, Levy A, Meziani L, Milliat F, Deutsch E. Radiotherapy-immunotherapy combinations – perspectives and challenges. *Mol Oncol.* juill 2020;14(7):1529-37.
 89. Golden EB, Chhabra A, Chachoua A, Adams S, Donach M, Fenton-Kerimian M, et al. Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *Lancet Oncol.* juill 2015;16(7):795-803.
 90. Formenti SC, Rudqvist N-P, Golden E, Cooper B, Wennerberg E, Lhuillier C, et al. Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade. *Nat Med.* déc 2018;24(12):1845-51.
 91. Carretero-González A, Lora D, Ghanem I, Zugazagoitia J, Castellano D, Sepúlveda JM, et al. Analysis of response rate with ANTI PD1/PD-L1 monoclonal antibodies in advanced solid tumors: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget.* 2 févr 2018;9(9):8706-15.
 92. Theelen WSME, Peulen HMU, Lalezari F, van der Noort V, de Vries JF, Aerts JGJV, et al. Effect of Pembrolizumab After Stereotactic Body Radiotherapy vs Pembrolizumab Alone on Tumor Response in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of the PEMBRO-RT Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 1 sept 2019;5(9):1276-82.
 93. Welsh J, Menon H, Chen D, Verma V, Tang C, Altan M, et al. Pembrolizumab with or without radiation therapy for metastatic non-small cell lung cancer: a randomized phase I/II trial. *J Immunother Cancer.* oct 2020;8(2):e001001.
 94. Dahmani A, Delisle J-S. TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers.* 11 juin 2018;10(6):E194.
 95. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* avr 2015;520(7547):373-7.
 96. Kalbasi A, Komar C, Tooker GM, Liu M, Lee JW, Gladney WL, et al. Tumor-Derived CCL2 Mediates Resistance to Radiotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 janv 2017;23(1):137-48.
 97. Abravan A, Eide HA, Helland Å, Malinen E. Radiotherapy-related lymphopenia in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving palliative radiotherapy. *Clin Transl Radiat Oncol.* mai 2020;22:15-21.
 98. Yovino S, Kleinberg L, Grossman SA, Narayanan M, Ford E. The Etiology of Treatment-related Lymphopenia in Patients with Malignant Gliomas: Modeling Radiation Dose to Circulating Lymphocytes Explains Clinical Observations and Suggests Methods of Modifying the Impact of Radiation on Immune Cells. *Cancer Invest.* 4 févr 2013;31(2):140-4.
 99. Pike LRG, Bang A, Mahal BA, Taylor A, Krishnan M, Spektor A, et al. The Impact of Radiation Therapy on Lymphocyte Count and Survival in Metastatic Cancer Patients Receiving PD-1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Int J Radiat Oncol.* janv 2019;103(1):142-51.
 100. Hecht M, Eckstein M, Rutzner S, von der Grün J, Illmer T, Klautke G, et al. Primary results of the phase II CheckRad-CD8 trial: First-line treatment of locally advanced

- head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with double checkpoint blockade and radiotherapy dependent on intratumoral CD8⁺ T-cell infiltration. *J Clin Oncol*. 20 mai 2021;39(15_suppl):6007-6007.
101. Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, Lopez-Bujanda Z, Theodros D, Mao W, et al. Stereotactic Radiotherapy Increases Functionally Suppressive Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res*. nov 2017;5(11):992-1004.
 102. Arina A, Beckett M, Fernandez C, Zheng W, Pitroda S, Chmura SJ, et al. Tumor-reprogrammed resident T cells resist radiation to control tumors. *Nat Commun*. déc 2019;10(1):3959.
 103. Weichselbaum RR. The 46th David A. Karnofsky Memorial Award Lecture: Oligometastasis-From Conception to Treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 nov 2018;36(32):3240-50.
 104. Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. févr 2016;54:139-48.
 105. Stock-Martineau S, Magner K, Jao K, Wheatley-Price P. Challenges of Immunotherapy in Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Oncol Pract*. août 2021;17(8):465-71.
 106. Deutsch E, Chargari C, Galluzzi L, Kroemer G. Optimising efficacy and reducing toxicity of anticancer radioimmunotherapy. *Lancet Oncol*. août 2019;20(8):e452-63.
 107. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. juin 2016;12(6):325-38.
 108. Lavigne J, Suissa A, Verger N, Dos Santos M, Benadjaoud M, Mille-Hamard L, et al. Lung Stereotactic Arc Therapy in Mice: Development of Radiation Pneumopathy and Influence of HIF-1 α Endothelial Deletion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juin 2019;104(2):279-90.
 109. Schubert P, Rutzner S, Eckstein M, Frey B, Schweizer C, Haderlein M, et al. Prospective Evaluation of All-lesion Versus Single-lesion Radiotherapy in Combination With PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Oncol*. 29 oct 2020;10:576643.
 110. McBride S, Sherman E, Tsai CJ, Baxi S, Aghalar J, Eng J, et al. Randomized Phase II Trial of Nivolumab With Stereotactic Body Radiotherapy Versus Nivolumab Alone in Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 1 janv 2021;39(1):30-7.
 111. Ratnayake G, Reinwald S, Shackleton M, Moore M, Voskoboynik M, Ruben J, et al. Stereotactic Radiation Therapy Combined With Immunotherapy Against Metastatic Melanoma: Long-Term Results of a Phase 1 Clinical Trial. *Int J Radiat Oncol*. sept 2020;108(1):150-6.
 112. Altorki NK, McGraw TE, Borczuk AC, Saxena A, Port JL, Stiles BM, et al. Neoadjuvant durvalumab with or without stereotactic body radiotherapy in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a single-centre, randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. juin 2021;22(6):824-35.
 113. Tian S, Switchenko JM, Buchwald ZS, Patel PR, Shelton JW, Kahn SE, et al. Lung Stereotactic Body Radiation Therapy and Concurrent Immunotherapy: A Multicenter Safety and Toxicity Analysis. *Int J Radiat Oncol*. sept 2020;108(1):304-13.
 114. Shaverdian N, Lisberg AE, Bornazyan K, Veruttipong D, Goldman JW, Formenti SC, et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol*. juill 2017;18(7):895-903.

115. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 13 déc 2018;379(24):2342-50.
116. Peters S, Felip E, Dafni U, Belka C, Guckenberger M, Irigoyen A, et al. Safety evaluation of nivolumab added concurrently to radiotherapy in a standard first line chemo-radiotherapy regimen in stage III non-small cell lung cancer—The ETOP NICOLAS trial. *Lung Cancer*. juill 2019;133:83-7.
117. Verma V, Simone C, Werner-Wasik M. Acute and Late Toxicities of Concurrent Chemoradiotherapy for Locally-Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*. 8 sept 2017;9(12):120.
118. Eisbruch A, Kim HM, Feng FY, Lyden TH, Haxer MJ, Feng M, et al. Chemo-IMRT of Oropharyngeal Cancer Aiming to Reduce Dysphagia: Swallowing Organs Late Complication Probabilities and Dosimetric Correlates. *Int J Radiat Oncol*. nov 2011;81(3):e93-9.
119. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 nov 2017;377(20):1919-29.
120. Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, et al. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*. mars 2009;373(9666):811-20.
121. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie AV, Haasbeek C, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial. *The Lancet*. mai 2019;393(10185):2051-8.
122. Gomez DR, Blumenschein GR, Lee JJ, Hernandez M, Ye R, Camidge DR, et al. Local consolidative therapy versus maintenance therapy or observation for patients with oligometastatic non-small-cell lung cancer without progression after first-line systemic therapy: a multicentre, randomised, controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*. déc 2016;17(12):1672-82.
123. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. déc 2018;392(10162):2353-66.
124. Kavi A, Gurewitz J, Benjamin CG, Silverman JS, Bernstein K, Mureb M, et al. Hippocampal sparing in patients receiving radiosurgery for ≥ 25 brain metastases. *Radiother Oncol*. août 2021;161:65-71.
125. Le Rhun E, Guckenberger M, Smits M, Dummer R, Bachelot T, Sahm F, et al. EANO–ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours. *Ann Oncol*. août 2021;S0923753421022146.
126. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. mai 2017;545(7652):60-5.
127. Qu C, Ping N, Kang L, Liu H, Qin S, Wu Q, et al. Radiation Priming Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma With High Tumor Burden. *J Immunother*. janv 2020;43(1):32-7.
128. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 21

- mars 2019;380(12):1116-27.
129. Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 8 avr 2021;384(14):1289-300.
 130. Kroeze SGC, Fritz C, Hoyer M, Lo SS, Ricardi U, Sahgal A, et al. Toxicity of concurrent stereotactic radiotherapy and targeted therapy or immunotherapy: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. févr 2017;53:25-37.
 131. Shukla N, Hanna N, Durm G. Optimal Duration of Maintenance Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Advanced NSCLC. *JCO Oncol Pract*. août 2021;17(8):472-4.
 132. Waterhouse DM, Garon EB, Chandler J, McCleod M, Hussein M, Jotte R, et al. Continuous Versus 1-Year Fixed-Duration Nivolumab in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: CheckMate 153. *J Clin Oncol*. 20 nov 2020;38(33):3863-73.
 133. Ahamadi M, Freshwater T, Prohn M, Li C, de Alwis D, de Greef R, et al. Model-Based Characterization of the Pharmacokinetics of Pembrolizumab: A Humanized Anti-PD-1 Monoclonal Antibody in Advanced Solid Tumors: Pharmacokinetics of Pembro in Solid Tumors. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. janv 2017;6(1):49-57.
 134. Van Limbergen EJ, Hoeben A, Lieveise RIY, Houben R, Overhof C, Postma A, et al. Toxicity of L19-Interleukin 2 Combined with Stereotactic Body Radiation Therapy: A Phase 1 Study. *Int J Radiat Oncol*. avr 2021;109(5):1421-30.
 135. Schaeue D, Ratikan JA, Iwamoto KS, McBride WH. Maximizing Tumor Immunity With Fractionated Radiation. *Int J Radiat Oncol*. juill 2012;83(4):1306-10.
 136. Serre R, Barlesi F, Muracciole X, Barbolosi D. Immunologically effective dose: a practical model for immuno-radiotherapy. *Oncotarget*. 7 août 2018;9(61):31812-9.
 137. Kosinsky Y, Dovedi SJ, Peskov K, Voronova V, Chu L, Tomkinson H, et al. Radiation and PD-(L)1 treatment combinations: immune response and dose optimization via a predictive systems model. *J Immunother Cancer*. déc 2018;6(1):17.
 138. Frey B, Rückert M, Weber J, Mayr X, Derer A, Lotter M, et al. Hypofractionated Irradiation Has Immune Stimulatory Potential and Induces a Timely Restricted Infiltration of Immune Cells in Colon Cancer Tumors. *Front Immunol [Internet]*. 8 mars 2017 [cité 28 sept 2021];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00231/full>
 139. Grayson JM, Harrington LE, Lanier JG, Wherry EJ, Ahmed R. Differential sensitivity of naive and memory CD8+ T cells to apoptosis in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 oct 2002;169(7):3760-70.
 140. Wildgruber M, Eisenblätter M. Molecular Imaging of Immunity and Inflammation and Its Impact on Precision Medicine. *Biomedicines*. 11 janv 2021;9(1):62.
 141. An Y-S, Kim S-H, Roh TH, Park SH, Kim T-G, Kim J-H. Correlation Between 18F-FDG Uptake and Immune Cell Infiltration in Metastatic Brain Lesions. *Front Oncol*. 24 juin 2021;11:618705.
 142. Barbolosi D, Hapdey S, Battini S, Faivre C, Mancini J, Pacak K, et al. Determination of the unmetabolised 18F-FDG fraction by using an extension of simplified kinetic analysis method: clinical evaluation in paragangliomas. *Med Biol Eng Comput*. janv 2016;54(1):103-11.
 143. Antonios JP, Soto H, Everson RG, Moughon DL, Wang AC, Orpilla J, et al. Detection of immune responses after immunotherapy in glioblastoma using PET and MRI. *Proc Natl Acad Sci*. 19 sept 2017;114(38):10220-5.

144. Ahern E, Solomon BJ, Hui R, Pavlakis N, O'Byrne K, Hughes BGM. Neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer: right drugs, right patient, right time? *J Immunother Cancer*. juin 2021;9(6):e002248.
145. Honjo T. Serendipities of Acquired Immunity. *TRENDS Sci*. 1 sept 2019;24(9):9_80-9_97.
146. Murthy V, Maitre P, Kannan S, Panigrahi G, Krishnatry R, Bakshi G, et al. Prostate-Only Versus Whole-Pelvic Radiation Therapy in High-Risk and Very High-Risk Prostate Cancer (POP-RT): Outcomes From Phase III Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol*. 10 avr 2021;39(11):1234-42.