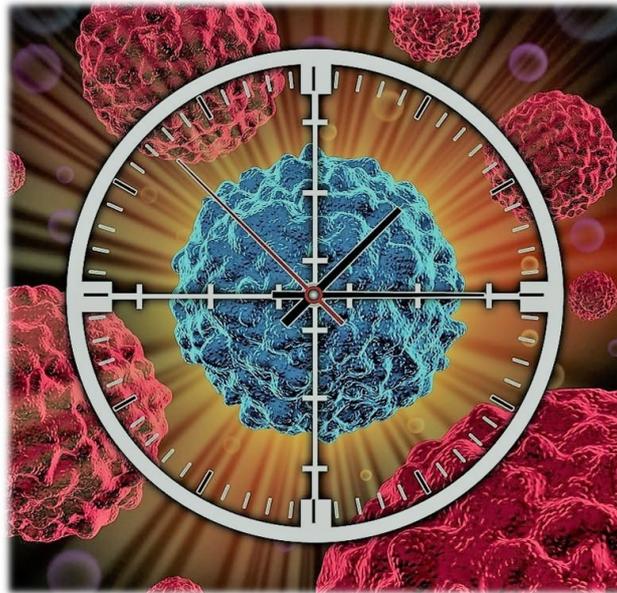


RAPPORT DE STAGE

MASTER II - BIOLOGIE, INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES

Modélisation mathématique de la chronotoxicité
spécifique au sexe d'un anticancéreux :
l'Irinotecan.



Par **Déborah BOYENVAL**

Master: Science de la Vie et de la Santé
Programme: Génétique, Immunité et Développement

Maître de stage : Dr. ANNABELLE BALLESTA
Équipe chronothérapie et cancers
Unité INSERM 935, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

June 11, 2018

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu à mon encadrante de stage : Annabelle Ballesta. Je te remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe *chronothérapie et cancer*. Je te suis très reconnaissante de m'avoir consacré du temps pour me transmettre tes connaissances pointues en mathématiques mais également en chronobiologie, et de m'avoir maintes fois prodiguées d'excellents conseils qui m'ont permis de développer ma démarche scientifique ainsi que mon esprit critique.

Je remercie chaleureusement Jean, un ingénieur d'étude incroyable et inimitable. Je te suis très reconnaissante de m'avoir inculqué les bonnes pratiques en biologie expérimentale. Merci de m'avoir formée aux techniques de western blot et de RT-qPCR. Ce fut une expérience très riche qui m'a notamment permis d'acquérir une connaissance approfondie en ce qui concerne les méthodes d'obtention des données en chronobiologie. Merci aussi pour toutes ces musiques que j'ai eu l'occasion de découvrir grâce à toi !

Merci à Sandrine Dulong et Xiao-Mei Li pour votre bienveillance et vos encouragements de tous les jours.

Enfin, je remercie l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées durant ce stage, pour les conversations très intéressantes qui n'auront de cesse de m'inspirer.

Abstract

The circadian system is a complex and highly integrated physiologic system that daily coordinates most of physiological and behavioural functions in mammals. This temporal organization results in variations in the toxicity of many anticancer drugs according to the time of administration. Irinotecan is a cytotoxic drugs commonly used to treat digestives cancers. Although it demonstrates a significant antitumor efficacy, it is often responsible for intestinal and hematologic toxicity, which can be life threatening. Preclinical and clinical results showed that irinotecan toxicities highly varies according to the time of drug administration. Indeed, cancer chronotherapy, that is administering anticancer drugs according to the patient's biological rhythms over the 24h span can reduce by up to 5-fold the occurrence of severe toxicities in both colon and bone marrow with regards to irinotecan. Furthermore, recent findings indicate that irinotecan's optimal timing critically depends on patient's sex.

Based on existing modelling works, a model of irinotecan chrono pharmacokinetics-pharmacodynamics (chronoPK-PD) in male and female mice has been designed. Subsequently, parameters has been estimated for both male and female mice according to available *in vitro* and mouse experimental datasets. Using these sex-specific models, an *in silico* experiment was achieved and focused on modelling drug toxicities in the intestine and the bone marrow.

In terms of global perspective, male and female chronotoxicities modelling in colon and bone marrow will be used at the aim of identifying circadian biomarkers which are the determinants of irinotecan tolerability circadian rhythms for both sexes. Next, the scaling of the mice chronoPK-PD model for humans will be initiated in view of set up personalized cancer chronotherapy firstly based on patient's sex.

Key-words: Circadian system, physiologically-based modelling, ordinary differential equations, sex specificity and chronotoxicity.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 1 |
| 1 Introduction bibliographique | 5 |
| 2 Objectifs du stage | 11 |
| 3 Matériels et méthodes | 13 |
| 3.1 Modélisation des rythmes circadiens par la méthode Cosinor | 13 |
| 3.2 La loi d'action de masse | 13 |
| 3.3 Modélisation d'une diffusion passive par la première loi de Fick | 14 |
| 3.4 Modélisation de la cinétique enzymatique par l'équation de Michaelis-Menten | 14 |
| 3.5 Méthode numérique de résolution des EDO | 15 |
| 3.6 Méthode d'estimation des paramètres du modèle PK-PD corps-entier | 15 |
| 3.7 Les données expérimentales à disposition | 15 |
| 3.7.1 Animaux et synchronisation | 15 |
| 3.7.2 Chronopharmacocinétique de l'irinotecan chez les souris B6D2F1 mâles et femelles | 16 |
| 3.7.3 Quantification des protéines ABCB1, CES, UGT, TOP1 et CYCA chez les souris B6D2F1 mâles et femelles | 16 |
| 3.8 Tests statistiques | 16 |
| 4 Résultats | 17 |
| 4.1 Les souris B6D2f1 mâles et femelles présentent un rythme circadien des protéines UGTA1, CES1, TOP1, ABCB1 et CYCA différents à la fois dans le colon et le foie. | 17 |
| 4.2 Le niveau d'exposition au SN38 est significativement différent dans le colon et la moelle osseuse selon le sexe de la souris et le ZT d'injection de l'irinotecan. | 21 |
| 4.3 Formalisation et mises à jour du modèle PK-PD corps-entier de l'irinotecan chez la souris, à base d'EDO. | 22 |
| 4.3.1 La pharmacocinétique | 22 |
| 4.3.2 La pharmacodynamique | 25 |
| 4.3.3 Les rythmes circadiens des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan | 26 |
| 4.3.4 Les paramètres fixés | 26 |
| 4.3.5 L'état initial du système | 27 |
| 4.4 Estimation des paramètres du modèle PK-PD pour les souris B6D2F1 mâles | 27 |
| 4.5 Simulation de la chronotoxicité hématologique et intestinale des souris B6D2F1 mâles. | 29 |
| 4.5.1 Mise en place d'une l'expérience <i>in silico</i> | 29 |
| 4.5.2 Chronotoxicités théoriques dans le colon et la moelle osseuse de souris B6D2F1 mâles | 30 |
| 4.6 Estimation <i>préliminaire</i> des paramètres du modèle PK-PD chez les souris B6D2F1 femelles et simulation <i>préliminaire</i> de leur chronotoxicité hématologique et intestinale. | 31 |
| 5 Discussion et perspectives | 32 |
| 5.1 Exploration des données expérimentales mâles et femelles à disposition . . . | 32 |
| 5.2 Critique du modèle PK-PD calibré chez les souris B6D2F1 mâles | 33 |

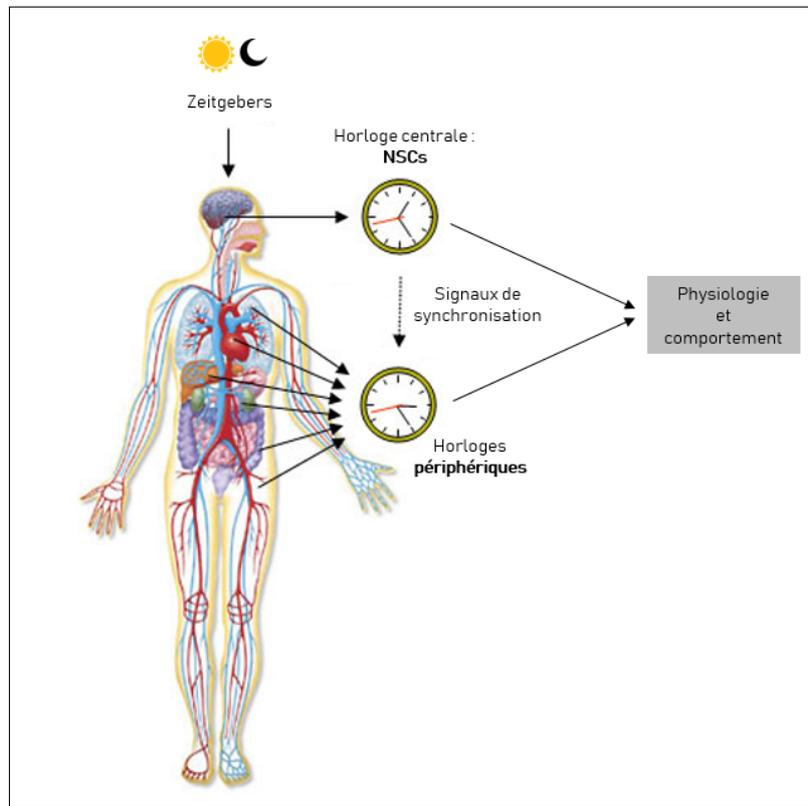
| | | |
|----------|---|------|
| 5.3 | Perspectives en modélisation | 33 |
| 5.3.1 | Calibration du modèle PK-PD femelle | 33 |
| 5.3.2 | Enrichissement de la méthode des moindres carrés par la méthode de Monte Carlo | 33 |
| 5.3.3 | Identification des déterminants circadiens spécifiques de la chrono- toxicité par analyse de sensibilité | 34 |
| 5.4 | Perspectives en recherches cliniques dans le cadre de la chronothérapie des cancers | 34 |
| 6 | Annexes | |
| 6.1 | Le logiciel <i>Circa Fourier</i> | |
| 6.2 | Le modèle PK-PD corps-entier : un système à 31 équations différentielles ordinaires mécanistes. | IV |
| 6.2.1 | Pharmacocinétique | IV |
| 6.2.2 | Pharmacodynamique | VIII |
| 6.3 | Les paramètres fixés du modèle PK-PD corps-entier chez les souris B6D2F1. | IX |
| 6.4 | Les valeurs estimées des paramètres du modèle PK-PD corps-entier chez les souris B6D2F1 <i>femelles</i> | XI |
| 6.5 | Estimation des paramètres du modèle PK-PD pour les souris B6D2F1 femelles | XIV |
| 6.6 | Chronotoxicités théoriques dans le colon et la moelle osseuse de souris B6D2F1 femelles | XIX |

1 Introduction bibliographique

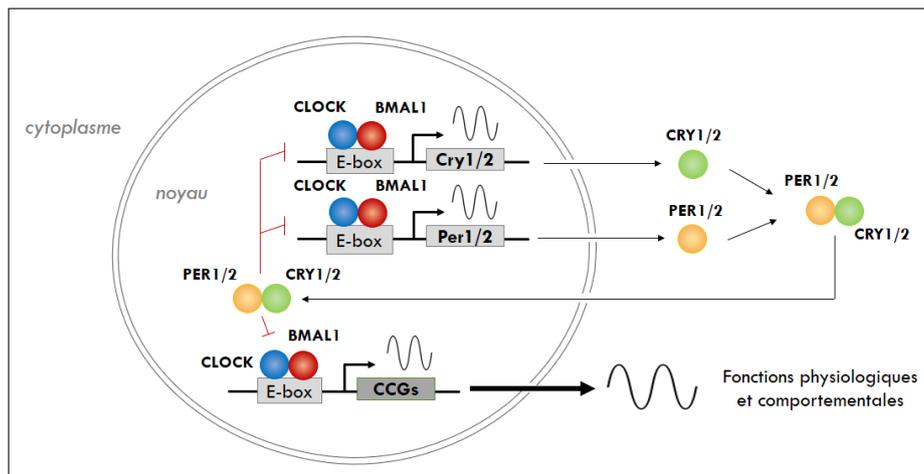
La plupart des fonctions physiologiques et comportementales des mammifères rythment sur 24h. Parmi elles, l'alternance activité-repos, la sécrétion de mélatonine et de cortisol, le cycle cellulaire ou encore la température corporelle [1] [2]. Ces rythmes d'une période comprise entre 20 et 28h sont qualifiés de circadiens, adjectif prenant étymologiquement racine du latin *circa* : « autour » et *diem* : « un jour ». Les rythmes circadiens sont générés par un système circadien lui-même structuré sous la forme d'un réseau d'horloges circadiennes. Il s'agit d'un système hiérarchique où l'on distingue une horloge centrale et des horloges périphériques (**figure 1a**). L'ensemble des cellules des noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus forment l'horloge centrale [3]. Les *zeitgebers* environnementaux (« donneur de temps » en allemand) sont des stimuli extérieurs perçus par les cellules de l'horloge centrale. Ils calibrent la période de ces dernières à 24h et ajustent leurs phases à celle du *zeitgeber* [4]. Chez les mammifères, le *zeitgeber* environnemental principal est l'alternance de la lumière et de l'obscurité, cycle généré par la rotation de la Terre autour de son axe. L'horloge centrale est considérée comme un *pacemaker* circadien car elle coordonne les rythmes circadiens en périphérie. En effet, elle transmet des signaux de synchronisation à l'ensemble des horloges périphériques présentes dans les tissus périphériques d'un organisme. Au sein d'un tissu périphérique, les horloges des cellules oscillent à une période et phase commune. Leurs rythmes sont principalement synchronisés via la température corporelle et les glucocorticoïdes, eux-mêmes sous contrôle de l'horloge centrale [5] [6].

Quel que soit le type de l'horloge (centrale ou périphérique) la rythmicité circadienne est endogène car elle persiste en l'absence de *zeitgeber* [4]. En effet, chaque cellule nucléée possède sa propre horloge moléculaire (**figure 1b**). Elle est constituée par plusieurs gènes, transcrits et protéines de l'horloge, organisés en boucles de rétroactions transcriptionnelles et post traductionnelles [3]. Parmi les éléments de cette boucle, on définit les activateurs : les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 et les inhibiteurs : les protéines PERs et CRYs. Les hétérodimères CLOCK/BMAL1 activent la transcription des gènes *Per* et *Cry* après s'être fixés sur la séquence proximale E-Box (Enhancer-box). Les protéines PERs et CRYs s'accumulent ensuite dans le cytoplasme, s'assemblent en hétérodimères PERs/CRYs et inhibent la transcription de leurs propres gènes en empêchant la fixation de CLOCK/BMAL1 sur la séquence E-box. De par sa structure, cette boucle de rétroaction négative génère des oscillations de la concentration de l'hétérodimère protéique CLOCK/BMAL1 qui à son tour se fixe rythmiquement sur la séquence E-box des gènes sous contrôle de l'horloge : les « clock-controlled genes » (CCGs). Ainsi l'horloge circadienne régulerait 43% des gènes chez la souris, à des niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. [7] [8].

Ces dernières décennies, des études pré-cliniques et cliniques ont démontré une variation circadienne de la toxicité selon l'heure d'administration de plus de 400 médicaments, dont 50 anticancéreux utilisés en chimiothérapie [1] (**figure 2a**). Ce stage se focalise sur l'étude d'un seul médicament anticancéreux : l'irinotecan. Il est couramment administré à des patients atteints de cancers colorectaux en phases avancées (III et IV). L'irinotecan est un antitumoral efficace mais néanmoins responsable de sévères effets secondaires, principalement des toxicités hématologique et digestive. Ces effets secondaires provoquent une forte dégradation de l'état général des patients (anémie, diarrhées, perte de poids ou encore immunodéficience) [9].



(a)



(b)

Figure 1 – Le système circadien des mammifères.

(a) **Organisation du système circadien.** Le système circadien est un système hiérarchisé composé d'horloges circadiennes localisées dans la plupart des cellules d'un organisme. On décompose ce système en 3 parties : i) l'horloge centrale localisée dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus, calibrée principalement par l'alternance jour-nuit, ii) les signaux de synchronisation générés par les NSC (e.g. les glucocorticoïdes ou la température) et iii) les horloges périphériques localisées dans les cellules de l'ensemble des tissus périphériques. Ce système génère les rythmes circadiens des processus physiologiques et comportementaux des individus. Figure adaptée de [10]. (b) **Représentation simplifiée de l'horloge circadienne moléculaire.** L'horloge moléculaire est un oscillateur composé de *gènes*, *transcrits* et *protéines* de l'horloge, organisés en une boucle de rétroaction négative. Parmi ces entités de l'horloge, on distingue les éléments activateurs (CLOCK, BMAL1) et les éléments inhibiteurs (PER1, PER2, CRY1, CRY2). Les protéines de l'horloges sont des facteurs de transcription qui se fixent sur la séquence régulatrice proximale E-box (*Enhancer-box*) des gènes qu'elles régulent. CLOCK et BMAL1 régulent les gènes sous contrôle de l'horloge (*Clock-controlled genes* ou *CCGs*) Figure adaptée de [3].

Une étude pré clinique réalisée au laboratoire sur des souris B6D2F1 montre que la toxicité intestinale varie de manière circadienne et d'un facteur 2 à 10 selon l'heure d'injection de l'irinotecan (**figure 2b**). À dose équivalente, l'amplitude et le maximum de toxicité sont significativement différents entre souris B6D2F1 mâles et femelles. L'heure d'injection qui correspond à la toxicité intestinale la plus élevée est évaluée à ZT23 chez les mâles (c.-à-d. la fin de la période d'activité des souris) et ZT03 (c.-à-d. la fin de leur période de repos) chez les femelles [11]. La variation de la toxicité d'un médicament selon son heure d'administration est qualifiée de chronotoxicité. Une étude clinique a également démontré une chronotoxicité spécifique au sexe chez des patients traités avec de l'irinotecan (**figure 2c**). Ces patients atteints d'un cancer colorectal métastatique présentent des symptômes sévères de toxicité hématologique. Elle se traduit notamment par une diminution drastique du nombre de neutrophiles dans le compartiment sanguin, aussi qualifiée de neutropénie. Outre une amplitude de toxicité plus élevée chez les femmes par rapport aux hommes, l'heure d'injection qui correspond à la neutropénie maximale est évaluée à 9h chez les hommes et 1h chez les femmes, soit un décalage de 8h [12].

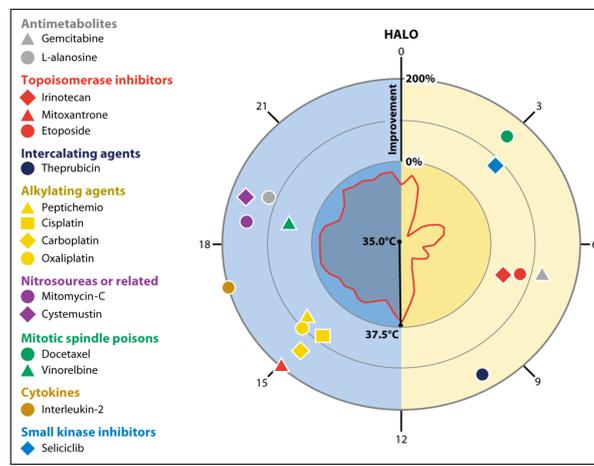
L'ensemble des résultats ci-dessus montre le besoin de moduler les traitements anticancéreux à la fois selon l'heure d'administration mais également selon le sexe du patient. L'enjeu est de personnaliser les traitements anticancéreux afin de minimiser les toxicités intestinales et hématologiques. Pour ce faire, l'équipe Inserm *chronothérapie et cancers* a développé une approche pluridisciplinaire combinant chronopharmacologie expérimentale et modélisation mathématique afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents responsables de la chronotoxicité spécifique au sexe de l'irinotecan.

Dans un premier temps, un modèle mathématique a été conçu à l'échelle de la cellule [13] (**figure 3a**). Ce modèle décrit tout d'abord la *pharmacocinétique* de l'irinotecan, autrement dit les mécanismes de transport et de transformation du médicament au sein de la cellule. L'irinotecan (CPT11) est absorbé par les cellules de manière passive. Il est bioactivé en un métabolite actif nommé SN38. Cette réaction est catalysée les enzymes carboxylestérases (CES). L'irinotecan sous sa forme active est transformé en un métabolite inactif nommé SN38G. Cette réaction est catalysée par les enzymes UDP-glucuronosyltransferases-1A (UGT1A). Les efflux actifs du CPT11, SN38 et SN38G sont pris en charge par les transporteurs ABC. Le modèle décrit dans une seconde partie la *pharmacodynamique* de l'irinotecan c'est-à-dire son mode d'action sur sa cible, en l'occurrence son activité cytotoxique. L'irinotecan sous sa forme active (SN38) est un inhibiteur de la topoisomérase I (TOP1). Cette dernière est une protéine qui relâche la tension de l'ADN superenroulé en coupant puis reliant un brin d'ADN. Le SN38 s'intercale entre TOP1 et l'ADN pour former spontanément un complexe réversible et empêche ainsi la religation du brin d'ADN. Ce complexe devient irréversible lorsqu'il rentre en collision avec des mécanismes parcourant l'ADN (e.g. la transcription ou encore la réplication de l'ADN). Cette collision entraîne des dommages irréversibles à l'ADN et déclenche des processus de réparation d'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire puis d'apoptose. Plusieurs études ont montré que les enzymes responsables de l'efflux de l'irinotecan (les transporteurs ABC), de sa bioactivation (CES) et de sa détoxification (UGT1As) ainsi que TOP1 sont sous le contrôle de l'horloge circadienne, à l'échelle des transcrits et des protéines chez la souris [14] [15]. Le modèle *cellulaire* prend ainsi en compte les variations circadiennes de la concentration de ces protéines.

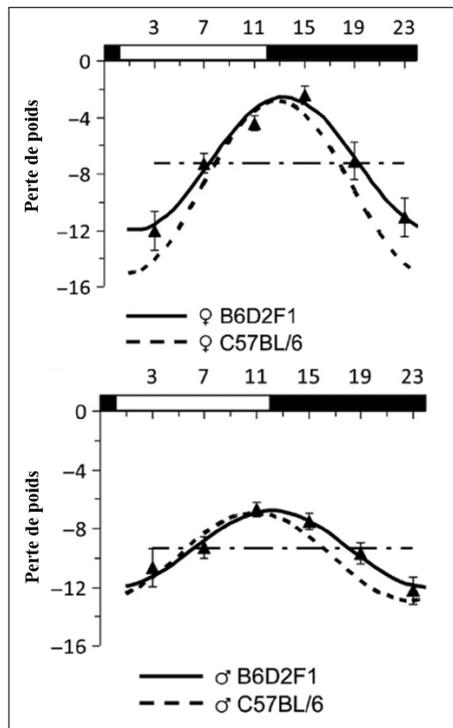
Le modèle cellulaire PK-PD (de l'anglais *pharmacokinetic-pharmacodynamic*), défini en

figure 3a, est capable de représenter fidèlement les données PK-PD expérimentales mesurées à partir de cellules de la lignée Caco-2¹ [13] [14]. Dans un second temps, le modèle PK-PD corps-entier a été conçu afin de modéliser la pharmacologie de l'irinotecan dans divers organes [16]. Enrichi en données anatomiques, le modèle PK-PD cellulaire a été transposé dans un système à compartiments représentant l'ensemble des organes impliqués dans la pharmacologie de l'irinotecan (**figure 3b**). La tumeur représente l'organe ciblé par la thérapie antitumorale, lieu où l'activité cytotoxique du médicament quantifie son efficacité. Le colon et la moelle osseuse représentent les deux cibles collatérales du médicament, lieux où l'activité cytotoxique du médicament quantifie respectivement sa toxicité intestinale et hématologique. Le foie représente le siège principal de l'activité de bioactivation et détoxification du médicament. La lumière intestinale prend en compte l'élimination du médicament par les fèces. Le sang représente le compartiment d'injection, de transport et d'élimination rénale de l'irinotecan. Le modèle corps-entier inclut également le cycle entéro-hépatique. Une fois absorbé par les cellules de la muqueuse coliques (entérocytes) le médicament est transporté par la veine porte vers le foie. Il est ensuite transporté via la voie biliaire jusqu'à la lumière intestinale dans laquelle il est réabsorbé par les entérocytes. Enfin, le NET (de l'anglais « Non Eliminating Tissues ») prend en compte l'ensemble des tissus non éliminant (e.g. les muscles, la peau, les tissus adipeux, etc.) dans lesquels le médicament ne fait qu'être transporté.

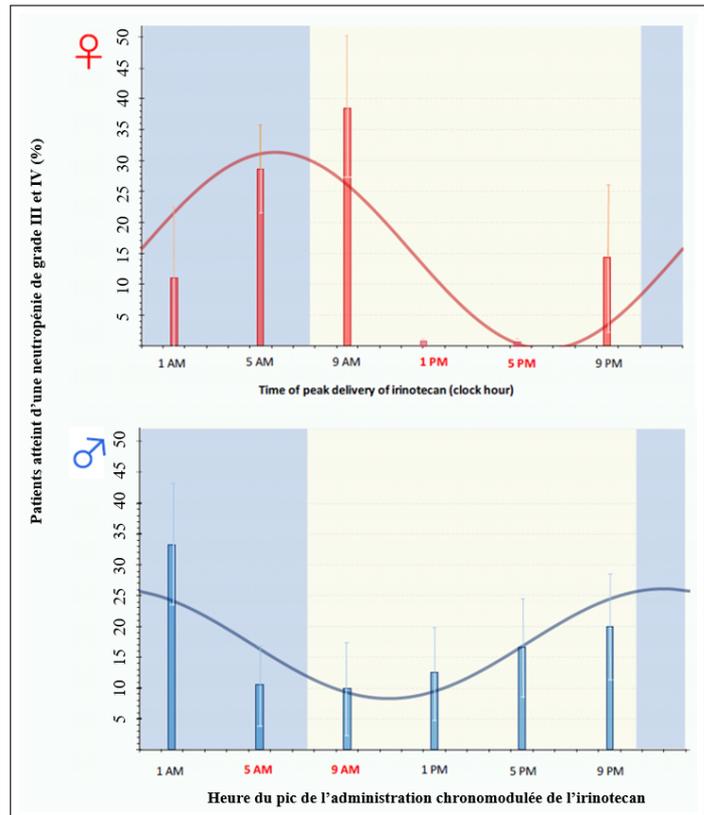
1. La lignée Caco-2 est une lignée de cellules d'adénocarcinome colorectal humain.



(a)



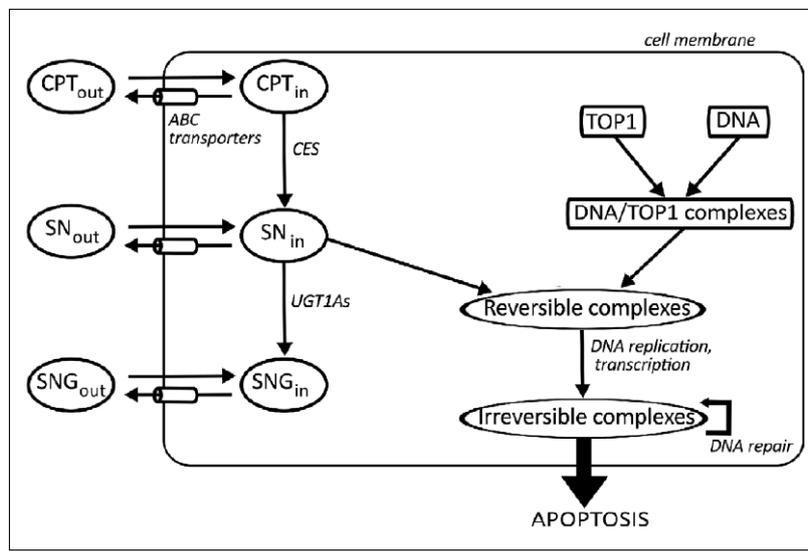
(b)



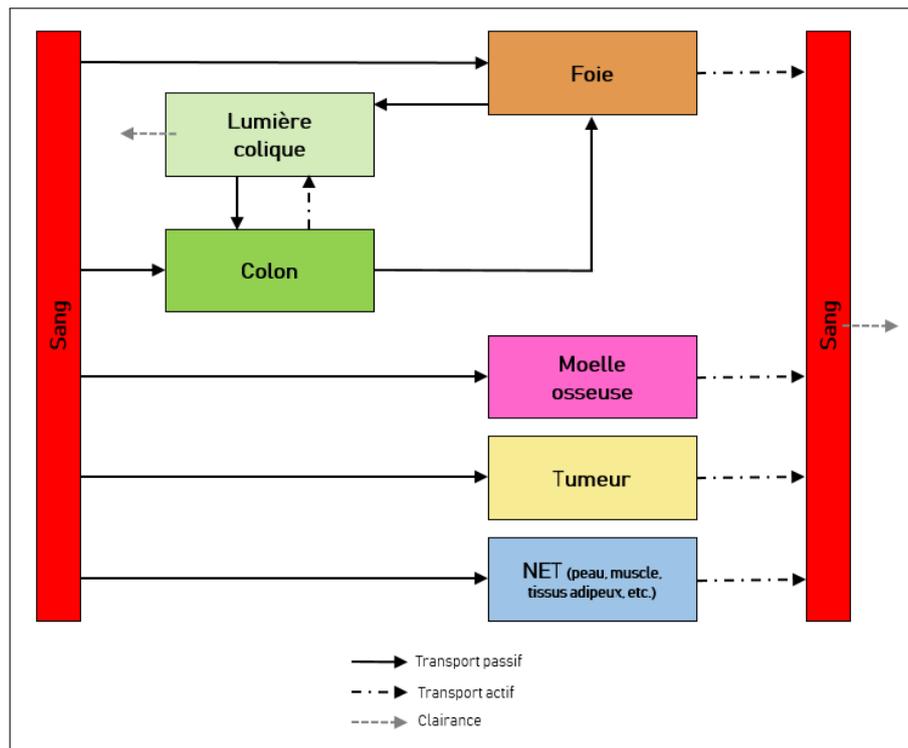
(c)

Figure 2 – Influence du système circadien sur la toxicité des médicaments anticancéreux.

(a) **Représentation schématique de la chronotolérance de 16 agents anticancéreux chez la souris.** Ce schéma regroupe les heures d'injection correspondant à la meilleure tolérabilité de 16 anticancéreux chez les souris B6D2F1 mâles, synchronisées par une alternance de 12h de lumière et 12h d'obscurité (LD12:12). L'unité de temps est le HALO (heures suivant le début de la phase lumineuse) et varie de 0 à 24h. Le ZT est une équivalence du HALO. Le pourcentage représente l'apport de l'injection chrono-modulée sur la survie moyenne des souris. En rouge est représentée la variation moyenne sur 24h de la température corporelle de ces souris. Cette variation représente un marqueur physiologique de l'horloge circadienne. Figure provenant de [1]. (b) **La chronotoxicité intestinale de l'irinotecan spécifique au sexe des souris B6D2F1 et C57BL/6.** La perte de poids (+SEM n=15-45) a été mesurée 4 jours après injection de l'irinotecan à 6 ZT différents. Quatre types de souris sont représentées : B6D2F1 et C57BL/6, mâles et femelles. Concernant les souris B6D2F1, la dose de l'irinotecan est fixée à 50mg/kg. Figure adaptée de [11]. (c) **La chronotoxicité hématologique de l'irinotecan spécifique au sexe des patients.** Pourcentage de patient atteint d'une neutropénie de grade avancé (3-4), 4 jours après injection de l'irinotecan. Ce pourcentage (+SEM n= 200) est calculé pour 6 groupes de patients ayant respectivement reçu le médicament à 6 heures d'injection différentes. Figure adaptée de [12].



(a)



(b)

Figure 3 – Modèle multi-échelle de la pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK-PD) de l'irinotecan.

(a) **Le modèle PK-PD cellulaire.** L'irinotecan sous ses trois formes (CPT, SN, SNG) est absorbé passivement par les cellules du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire. Il est transporté à l'extérieur de la cellule *via* les pompes à efflux ABC. La réaction de bioactivation du CPT11 (CPT) en SN38 (SN) est catalysée par l'enzyme CES. La réaction de désactivation du SN38 en SN38G (SNG) est catalysée par l'enzyme UGT1A. Le SN38 participe à la formation du complexe ADN-TOP1-SN38 appelé complexe réversible. Ce complexe devient irréversible après être entré en collision avec la machinerie de réplication de la cellule. Cet événement entraîne la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire voire de l'apoptose. Figure adaptée de [14] (b) **Le modèle corps-entier.** Le modèle cellulaire présenté ci-haut est transposé dans les différents organes qui entre en jeu dans la pharmacologie de l'irinotecan. Figure adaptée de [16].

2 Objectifs du stage

Mon laboratoire d'accueil s'attèle à identifier quels sont les mécanismes moléculaires qui déterminent la chronotoxicité spécifique au sexe de l'irinotecan. À partir d'un modèle PK-PD corps-entier défini ci-haut, l'objectif principal du stage consistait à formaliser et simuler la chronotoxicité du médicament chez les souris B6D2F1 mâles et femelles, principalement dans le colon et la moelle osseuse. Ces simulations représenteront en aval du stage le support d'une analyse de sensibilité qui permettra de conclure sur les principaux déterminants moléculaires de la chronotoxicité du médicament, distinctement chez les souris mâles et les femelles. Afin d'atteindre cet objectif, mon stage s'articule autour de quatre axes principaux.

Modéliser statistiquement les rythmes circadiens des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan, dans le colon et le foie des souris B6D2F1

Le laboratoire possède les séries temporelles des concentration des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan (ABCB1, CES1, UGT1A et TOP1) dans le colon et le foie de souris B6D2F1 mâles et femelles. La première étape du stage consistait à déterminer si ces séries temporelles suivent un rythme circadien différent selon le sexe et à modéliser ces rythmes par une équation cosinor à plusieurs harmoniques pour chacun des deux sexes. À cet effet et n'ayant pas accès à un programme d'analyse de rythmes circadiens à plusieurs harmoniques, j'ai conçu sur Matlab le programme générique nommé *Circa Fourier* qui est en mesure de réaliser ces tâches à partir de n'importe quelle série temporelle expérimentale en entrée (**annexe 6.1**).

Comparer des données de pharmacocinétiques expérimentales des souris B6D2F1 mâles et femelles

Le laboratoire a récolté des données de pharmacocinétique (PK) du SN38 (métabolite actif de l'irinotecan) dans le sang, la moelle osseuse, le foie et la tumeur xénotransplantée de souris B6D2F1 mâles et femelles, pour deux heures d'injection différentes. Ainsi en amont de l'étape de modélisation des mécanismes PK-PD de l'irinotecan, la seconde étape du projet consistait à comparer les niveaux cumulés du métabolite actif de l'irinotecan (SN38) dans les organes cibles de toxicité selon deux facteurs : le sexe de la souris et l'heure d'injection du médicament.

Formalisation de la pharmacologie de l'irinotecan sous la forme d'un système d'équations différentielles ordinaires et estimation des paramètres chez les mâles et les femelles.

En amont du stage, une première version du modèle PK-PD corps-entier a été formalisée à base d'équations différentielles ordinaires. L'estimation préliminaire des paramètres PK-PD du modèle a été calibrée chez les souris B6D2F1 mâles. Particulièrement, cette estimation préliminaire ne reproduit pas fidèlement la cinétique de l'irinotecan dans le colon et la moelle osseuse, alors qu'il s'agit des deux organes cibles de toxicité du médicament [16]. Par conséquent, une partie du stage consistait à vérifier puis modifier l'ensemble des EDO du premier modèle PK-PD corps-entier, si la littérature le justifiait. Consécutivement, les valeurs des paramètres du modèle PK-PD ont été ré-estimées pour les souris

mâles et femelles, mais cette fois à partir du modèle mis à jour.

Simuler la chronotoxicité intestinale et hématologique de l'irinotecan à partir du modèle PK-PD mâle et femelle

Enfin, à partir d'un modèle PK-PD fidèle aux données biologiques, une expérience *in silico* consistait à quantifier la toxicité intestinale et hématologique de l'irinotecan pour une centaine de ZT d'injection, variant entre ZT0 et ZT24, respectivement dans les compartiments *colon* et *moelle* des souris B6D2F1 mâles et femelles.

3 Matériels et méthodes

3.1 Modélisation des rythmes circadiens par la méthode Cosinor

Le rythme circadien de la concentration des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan (ABCB1, ABCG2, CES1, UGT1A, TOP1 et CYCA) au cours du temps est modélisé mathématiquement par l'équation *Cosinor* ci-dessous :

$$proteine(t) = M \times (1 + (A24 \times \cos\left[\frac{2\pi}{24} \times (t - \phi24)\right])) \quad (1)$$

où M , $A24$ et $\phi24$ sont des paramètres circadiens décrivant respectivement la valeur moyenne de l'oscillation, l'amplitude² et l'acrophase³ d'une oscillation d'une période⁴ de 24h.

La série temporelle d'un phénomène oscillatoire peut être subdivisée en plusieurs composantes appelées harmoniques, multiple de la composante principale. La composante principale d'un rythme circadien est une oscillation sur une période de 24h. Une équation *Cosinor* à 2 harmoniques représente une oscillation circadienne avec une période de 24h superposée à une période de 12h.

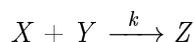
$$proteine(t) = M \times (1 + (A24 \times \cos\left[\frac{2\pi}{24} \times (t - \phi24)\right]) + (A12 \times \cos\left[\frac{2\pi}{12} \times (t - \phi12)\right])) \quad (2)$$

où M , $A24$ et $\phi24$ sont décrits plus haut et $A12$ et $\phi12$ décrivent respectivement l'amplitude d'une oscillation d'une période et l'acrophase associées à une période de 12h.

3.2 La loi d'action de masse

La modélisation de réactions biochimiques se base souvent sur la loi d'action de masse. Cette loi suppose que le taux de réaction est proportionnel à la concentration en réactif(s) dans la mesure où le milieu de réaction est homogène et le nombre de molécule de chaque réactif très grand.

Considérons l'exemple suivant : une réaction chimique qui transforme deux réactifs notés X et Y en un produit noté Z à un taux de réaction noté k :



La variation des concentrations de X , Y et Z au cours du temps est modélisée par le système d'ODE défini par :

$$\begin{aligned} \frac{d[X]}{dt} &= -k[X][Y] \\ \frac{d[Y]}{dt} &= -k[X][Y] \\ \frac{d[Z]}{dt} &= k[X][Y] \end{aligned} \quad (3)$$

2. L'amplitude correspond à la demi-distance qui sépare la valeur maximale de la valeur minimale de l'oscillation.

3. Une acrophase correspond au pic de l'oscillation.

4. Dans ce contexte, la période correspond à la distance séparant deux acrophases consécutives.

Définition adaptée de [17].

3.3 Modélisation d'une diffusion passive par la première loi de Fick

La diffusion passive d'une espèce chimique à travers la membrane plasmique semi-perméable d'une cellule est modélisée par la première loi de Fick.

Soient une espèce chimique notée C , sa concentration et son volume extracellulaire respectivement notés C_{extra} et V_{out} , sa concentration et son volume intracellulaire respectivement notés C_{intra} et V_{in} , la perméabilité de la membrane plasmique notée ρ et la surface de contact entre le milieu extracellulaire et intracellulaire notée S . Cette loi établit que la quantité de matière qui diffuse du compartiment extracellulaire au compartiment intracellulaire est proportionnelle au gradient de concentration de part et d'autre de la membrane.

En se basant sur la loi d'action de masse, le flux de C du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire, noté F , est donné par :

$$F = \rho \times S \times (C_{out} - C_{in}) \quad (4)$$

En considérant la loi d'action de masse on obtient :

$$C_{out} \xrightarrow{k_{out_in}} C_{in}$$

$$\frac{dC_{in}}{dt} = -k_{out_in} \times C_{out} \quad (5)$$

où $k_{out_in} = \rho \times \frac{S}{V_{in}}$.

Et

$$\frac{dC_{out}}{dt} \times \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{out_in'} \times C_{out} \quad (6)$$

où $k_{out_in'} = k_{out_in} \times V_{in}$.

3.4 Modélisation de la cinétique enzymatique par l'équation de Michaelis-Menten

La vitesse de réaction des enzymes catalysant l'efflux de l'irinotecan (ABCB1 et ABCG2) et des enzymes catalysant la métabolisation du médicament (CES1 et UGT1A) est modélisée par l'équation de *Michaelis-Menten*.

Considérons par exemple la réaction suivante :



où E, S, ES et P symbolisent respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat et les produits.

D'après la loi d'action de masse on obtient :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (7)$$

On considère la loi de conservation de la matière suivante : $E_0 = E + ES$ avec E_0 la concentration totale en enzyme. À l'état stationnaire défini par *Briggs et Haldane*, on

suppose que la vitesse de formation du complexe ES est nulle [18]. Autrement dit, la vitesse de dissociation du complexe ES est égale à sa vitesse de formation. On définit ainsi la relation de *Michaelis-Menten* par :

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

où v représente la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme E, S la concentration en substrat, $V_{max} = k_2 E_0$ et $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$. V_{max} représente la vitesse maximale de la réaction, atteinte lorsque la totalité des enzymes est associée au substrat S. K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse maximale de réaction est égale à $\frac{V_{max}}{2}$.

3.5 Méthode numérique de résolution des EDO

Les équations différentielles ordinaires définies dans ce rapport ont été résolues par approximation de leurs solutions exactes. Pour ce faire, un solveur d'équation différentielles ordinaires *MATLAB* a été utilisé pour résoudre des problèmes dits "raides". Un problème est *raide* si les méthodes numériques usuelles (e.g. Runge & Kutta d'ordre 4) calculent sa solution approchée en un nombre déraisonnablement grand d'itérations. Par conséquent j'ai utilisé le solveur d'EDO *MATLAB ode15s* particulièrement adapté aux problèmes raides définis dans le cadre de la modélisation PK-PD de l'irinotecan.

3.6 Méthode d'estimation des paramètres du modèle PK-PD corporel

Les paramètres du modèle PK-PD construit à base d'EDO sont estimés *via* la méthode des moindres carrés améliorés. Cette méthode consiste à trouver les valeurs de paramètres d'un modèle pour lesquels la différence entre des données expérimentales et le modèle mathématique est minimale. On considère un modèle noté f qui comporte un ensemble de paramètres noté θ , un ensemble de N mesures expérimentales noté $(y_1, y_2 \dots y_i)$ de la variable x, un poids noté w_i , et un ensemble de contraintes sur les paramètres notées $g(\theta)$. La méthode des moindres carrés pondérés minimise la quantité suivante :

$$c = \sum_{i=1}^N w_i (y_i - f(x_i; \theta))^2 - g(\theta) \quad (9)$$

La tâche de minimisation est prise en charge par l'algorithme d'optimisation *CMA-ES* (Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy). Dans le cadre de l'optimisation dans un domaine continu, l'algorithme le plus performant à l'heure actuelle est la méthode *CMA-ES*. Basée sur le principe d'évolution darwinienne des espèces, cette méthode stochastique est particulièrement adaptée aux problèmes d'optimisation non linéaires de fonctions non convexes et possédant de multiples minima locaux. Cette méthode est décrite en détails par son développeur Nikolaus Hansen [19].

3.7 Les données expérimentales à disposition

3.7.1 Animaux et synchronisation

Les données expérimentales utilisées pour la calibration du modèle PK-PD chez les souris proviennent de souris B6D2F1 mâles et femelles (femelle C57BL/6 × mâle DBA2) âgées entre 6 et 8 semaines et provenant de la compagnie *Janvier*. Dès leur arrivée en laboratoire,

ces souris sont placées dans un caisson de synchronisation à température contrôlée (21-23 ° C) programmé pour alterner 12h de lumière et 12h d'obscurité (LD12:12). Ces souris sont nourries et hydratées *ab libitum* pendant les 3 semaines précédant une expérience. Par convention, ZT0 correspond au début de la phase lumineuse et ZT12 correspond au début de la phase d'obscurité.

3.7.2 Chronopharmacocinétique de l'irinotecan chez les souris B6D2F1 mâles et femelles

L'irinotecan sous sa forme hydrochloride (20mg/mL. Aventis, Milan, Italie) est dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%). La solution dosée à 50mg/kg est administrée une seule fois à des souris B6D2F1 mâles et femelles par voie intraveineuse (IV) dans le sinus rétro-orbitaire. Une tumeur d'ostéosarcome de Glasgow d'origine murine a été xenogreffée par voie sous-cutanée sur le dos des souris B6D2F1. Ces souris sont sacrifiées avant le prélèvement du sang, de la moelle osseuse, du colon, du foie et de la tumeur 30min, 1h, 2h, 6h et 18h après administration du médicament à différentes horaires : ZT11 et ZT23 pour les mâles et ZT15 et ZT03 pour les femelles. Ces deux heures d'injections correspondent aux heures d'injection induisant une toxicité maximale (ZTW pour *ZT de pire tolérance*) et minimale (ZTB pour *ZT de meilleure tolérance*) chez les souris B6D2F1 [11]. Les concentrations en CPT11, SN38 et SN38G sont quantifiées par HPLC dans chacun des tissus. Le protocole détaillé de cette expérience est disponible en [15].

3.7.3 Quantification des protéines ABCB1, CES, UGT, TOP1 et CYCA chez les souris B6D2F1 mâles et femelles

Le colon et le foie ont été prélevés après euthanasie de souris B6D2F1 n'ayant pas reçu d'injection d'irinotecan. Ces organes ont été placés dans des cassettes puis conservés dans une solution de formol avant l'inclusion en paraffine. Les protéines CES1, UGT1A, TOP1 dans le colon et le foie, et la protéine CycA dans le colon, ont été quantifiées par immunohistochimie quantitative à ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21 et ZT24. Le protocole détaillé est disponible en [15]. Les protéines ABCB1 dans le colon et le foie ont été quantifiées par technique ELISA à ZT1, ZT4, ZT7, ZT10, ZT13, ZT16, ZT19 et ZT22. Le protocole détaillé est disponible en [20].

3.8 Tests statistiques

Les différences de pharmacocinétique mesurée dans le colon et la moelle osseuse entre 4 groupes de souris B6D2F1 (mâles et femelles, et injectées à ZTB et ZTW) ont été validées statistiquement par une ANOVA à deux facteurs (sexe et ZT d'injection) sur les AUC calculés à partir des données PK. Ce test est complété par un test de comparaison multiple. L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés sur *MATLAB*.

4 Résultats

4.1 Les souris B6D2f1 mâles et femelles présentent un rythme circadien des protéines UGTA1, CES1, TOP1, ABCB1 et CYCA différents à la fois dans le colon et le foie.

Les protéines CES1, UGT1A, TOP1 et ABCB1 dans le colon et le foie, et la protéine CYCA dans le colon, ont été quantifiées sur 24h par immunohistochimie chez des souris B6D2F1 mâles et femelles (**section 3.7.3**). Aussi, une étude montre que les gènes CES1, UGT1A, TOP1 et ABCB1 présentent des rythmes circadiens à l'échelle de la transcription dans des cellules Caco-2 synchronisées [14]. Sachant que ces protéines interviennent dans la modélisation de la pharmacologie de l'irinotecan, j'ai vérifié la significativité de leurs rythmes et construit un modèle descriptif de ces données à l'aide du programme *Circa Fourier* que j'ai conçu (description en **annexe 6.1**). Les paramètres issus de ces modèles descriptifs sont détaillés en **figures 4 et 5** et seront ensuite transposés au modèles PK-PD corps-entiers de l'irinotecan mâles et femelles. Dans le colon de souris B6D2F1 mâles, les protéines CES1 et UGT1A présentent une rythmicité significative : circadienne à deux harmonies pour la protéine CES1 et ultradienne pour la protéine UGT1A (période = 12h). Les protéines ABCB1, TOP1 et CYCA, quant à elles, présentent une arythmie dans cet organe. En revanche, les protéines ABCB1 et CYCA suivent un rythme ultradien (période = 12h) chez les souris femelles B6D2F1, contrairement aux protéines CES1, UGTA et TOP1 qui présentent une arythmie dans le colon. En ce qui concerne le foie des souris mâles, TOP1 et UGT1A suivent un rythme circadien significatif tandis que les autres protéines sont arythmiques. Chez les femelles, TOP1 est également rythmique mais sur une période de 12h. Les protéines UGT1A et ABCB1 montrent une rythmicité circadienne à 2 harmonies significatives tandis que CES1 ne rythme pas. Particulièrement dans le colon qui représente la cible de toxicité du médicament, on note que ce sont les enzymes de bioactivation et de détoxification de l'irinotecan qui rythment chez les mâles alors que ce sont les pompes à efflux et le marqueur de la phase S qui présentent une rythmicité chez les femelles. En somme, ces résultats nous indiquent que les protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan ont des profils rythmiques qui diffèrent selon le sexe des souris B6D2F1.

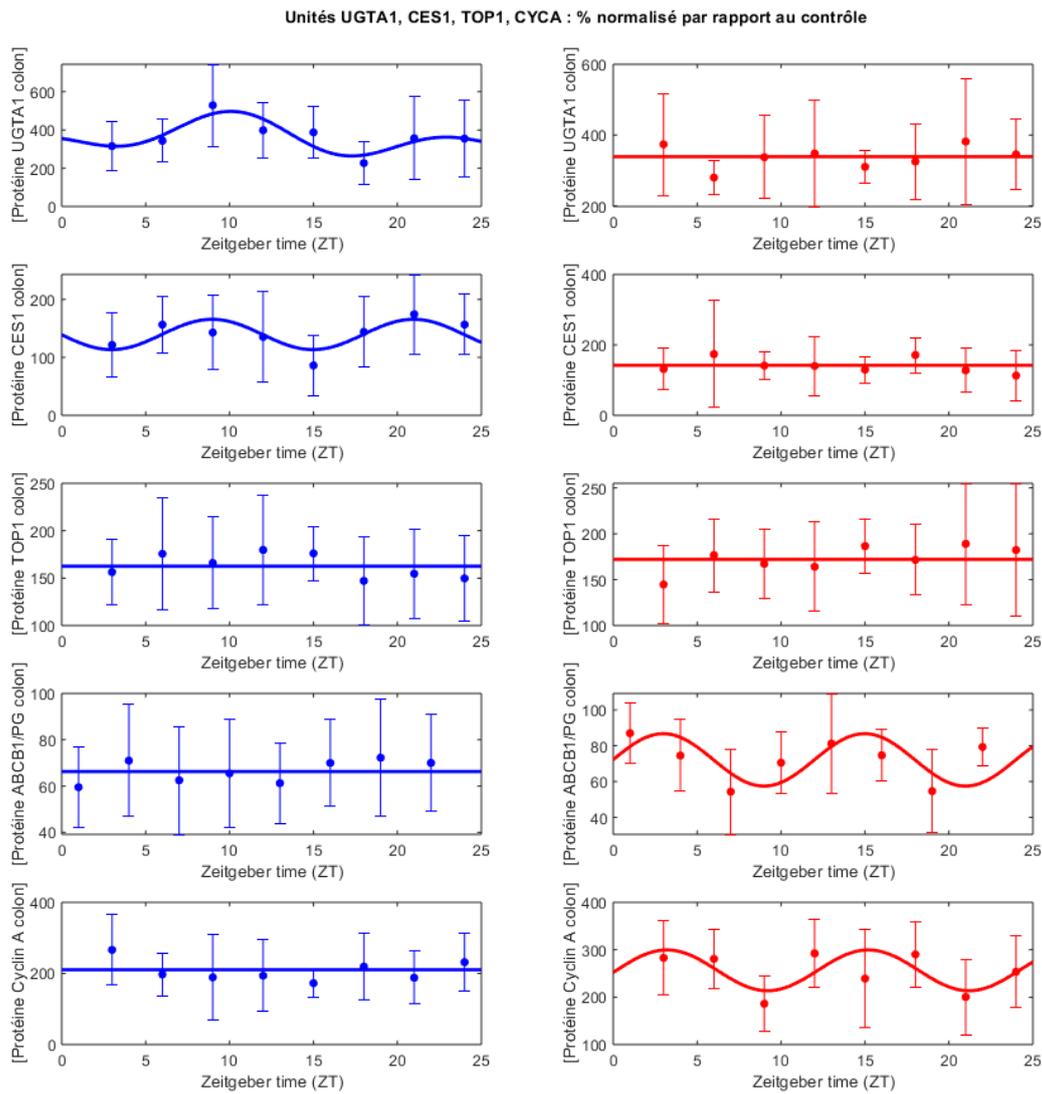


Figure 4 – **Variation circadienne des concentrations des protéines impliquées dans la pharmacologie de l’irinotecan dans le *colon* de souris B6D2F1 mâles et femelles synchronisées en LD12 : 12.** Chaque point correspond à la concentration moyenne de la protéine mesurée dans le colon des souris mâles (en bleu) et femelles (en rouge). À chacun des points de mesure est associé une erreur standard à la moyenne ($n = 11 - 15$). Les courbes en traits pleins bleus et rouges représentent le meilleur ajustement aux données expérimentales respectivement dans le colon et la moelle osseuse (données décrites en section 3.7.3) par l’équation cosinor à deux harmoniques (définie en section 6.1).

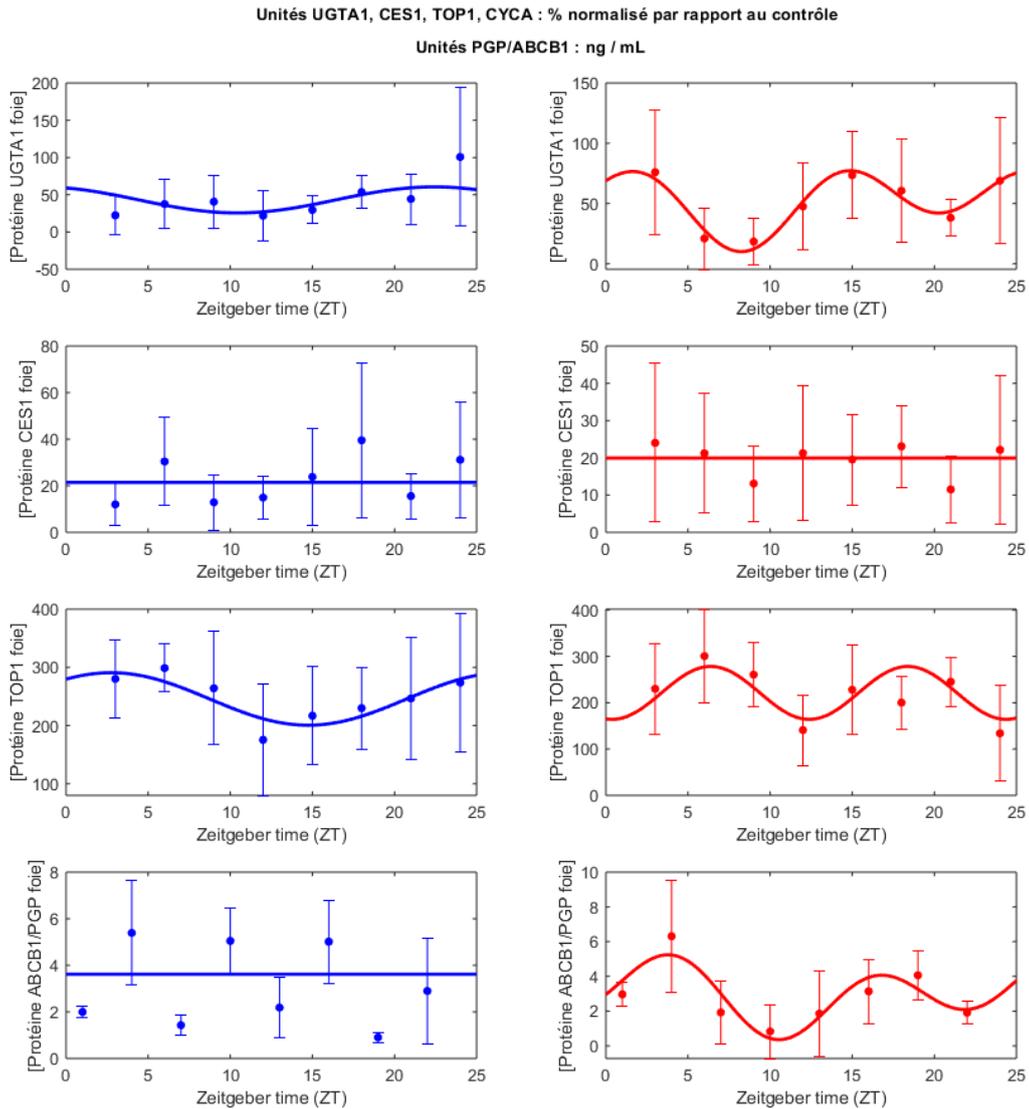


Figure 5 – **Variation circadienne des concentrations des protéines impliquées dans la pharmacologie de l’irinotecan dans le foie de souris B6D2F1 mâles et femelles synchronisées en LD12 : 12.** Chaque point correspond à la concentration moyenne de la protéine mesurée dans le colon des souris mâles (en bleu) et femelles (en rouge). À chacun des points de mesure est associé une erreur standard (SEM) avec $n = 11 - 15$). Les courbes en traits pleins bleus et rouges représentent le meilleur ajustement aux données expérimentales respectivement dans le colon et la moelle osseuse (données décrites en section 3.7.3) par l’équation cosinor à deux harmoniques (définie en section 6.1).

| Souris B6D2F1 ♂ - Colon | | | | | |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------|----------------------|-----------------------|
| | ABCB1 | CES1 | TOP1 | UGTA1 | CYCA |
| M | 66.292 ±2.4764 | 139.54 ±5.9128 | 162.53 ±4.5429 | 363.42 ±16.197 | 210.26 ±8.8167 |
| A24 | NS | NS | NS | 0.19994 ±0.062718 ** | NS |
| φ24 | NS | NS | NS | 8h57 ±1h13 | NS |
| A12 | NS | 0.18726 ±0.059768 ** | NS | 0.17862 ±0.063854 * | NS |
| φ12 | NS | 8h57 ±0h37 | NS | 10h22 ±0h40 | NS |
| Souris B6D2F1 ♀ - Colon | | | | | |
| | ABCB1 | CES1 | TOP1 | UGTA1 | CYCA |
| M | 72.105 ±2.264 | 142.11 ±7.3733 | 172.13 ±4.7068 | 338.94 ±11.755 | 256.57 ±7.8635 |
| A24 | NS | NS | NS | NS | NS |
| φ24 | NS | NS | NS | NS | NS |
| A12 | 0.20265 ±0.046122 *** | NS | NS | NS | 0.16761 ±0.042975 *** |
| φ12 | 2h58 ±0h24 | NS | NS | NS | 3h11 ±0h28 |

| Souris B6D2F1 ♂ - Foie | | | | |
|------------------------|---------------------|---------------|-----------------------|---------------------|
| | ABCB1 | CES1 | TOP1 | UGTA1 |
| M | 3.6175 ±0.33514 | 21.47 ±2.1128 | 245.72 ±8.8299 | 43.116 ±4.9735 |
| A24 | NS | NS | 0.18348 ±0.051091 *** | 0.40521 ±0.16875 * |
| φ24 | NS | NS | 2h44 ±1h04 | 22.426 ±1h33 |
| A12 | NS | NS | NS | NS |
| φ12 | NS | NS | NS | NS |
| Souris B6D2F1 ♀ - Foie | | | | |
| | ABCB1 | CES1 | TOP1 | UGTA1 |
| M | 2.9228 ±0.27762 | 19.93 ±1.6343 | 221.11 ±8.7481 | 50.851 ±3.799 |
| A24 | 0.36008 ±0.135 ** | NS | NS | 0.31435 ±0.1008 ** |
| φ24 | 0h31 ±1h25 | NS | NS | 8h10 ±1h19 |
| A12 | 0.57258 ±0.1346 *** | NS | 0.25815 ±0.059898 *** | 0.48643 ±0.1048 *** |
| φ12 | 4h14 ±0h28 | NS | 6h23 ±0h24 | 2h15 ±0h25 |

Table 1 – **Paramètres des rythmes circadiens des protéines impliquées dans la pharmacologie de l’irinotecan.** Les amplitudes (A24 et A12) sont exprimées en unités arbitraires (u.a) et les acrophases (φ24 et φ12) en heure. Ces paramètres sont estimés *via* le programme *Circa Fourier* décrit en **annexe 6.1.**

4.2 Le niveau d'exposition au SN38 est significativement différent dans le colon et la moelle osseuse selon le sexe de la souris et le ZT d'injection de l'irinotecan.

La pharmacocinétique du CPT11 et du SN38 a été quantifiée par HPLC dans le sang, la moelle osseuse, le colon, le foie ainsi que dans la tumeur xénogreffée des souris B6D2F1 mâles et femelle (3.7.2). Le SN38 représente la forme cytotoxique de l'irinotecan. Aussi, le colon et la moelle osseuse sont les organes cibles de la toxicité hématologique et intestinale de l'irinotecan. Ainsi dans une première approche, j'ai comparé la concentration cumulée de ce métabolite actif dans le colon et la moelle osseuse des souris mâles et femelles, et à deux heures d'injection différentes notées ZTB et ZTW (**section 3.7.2**). Pour ce faire j'ai calculé, pour le colon et la moelle osseuse, l'aire sous la courbe (AUC) des cinétiques via la méthode d'intégration trapézoïde préprogrammée en Matlab. L'AUC calculée représente le niveau d'exposition des organes au SN38 durant les 18h qui suivent l'injection. Une ANOVA à deux facteurs (sexe et ZT d'injection) a mis évidence une différence significative du niveau d'exposition des organes au SN38, selon le sexe, le ZT d'injection et l'interaction des deux, avec $p < 0.001$ (**figure 6**). Consécutivement, j'ai réalisé un test de comparaison multiple mettant en évidence les résultats suivants : les mâles sont exposés à une concentration cumulée en SN38 significativement plus grande que les femelles dans le colon, inversement dans la moelle osseuse. En outre indépendamment du sexe de la souris, le niveau d'exposition au SN38 est significativement plus petit à ZTB par rapport à ZTW dans le colon, inversement pour la moelle osseuse. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence en amont du processus de modélisation une différence significative du niveau d'exposition au métabolite actif selon le sexe et le ZT d'injection, dans les organes cibles de toxicité de l'irinotecan.

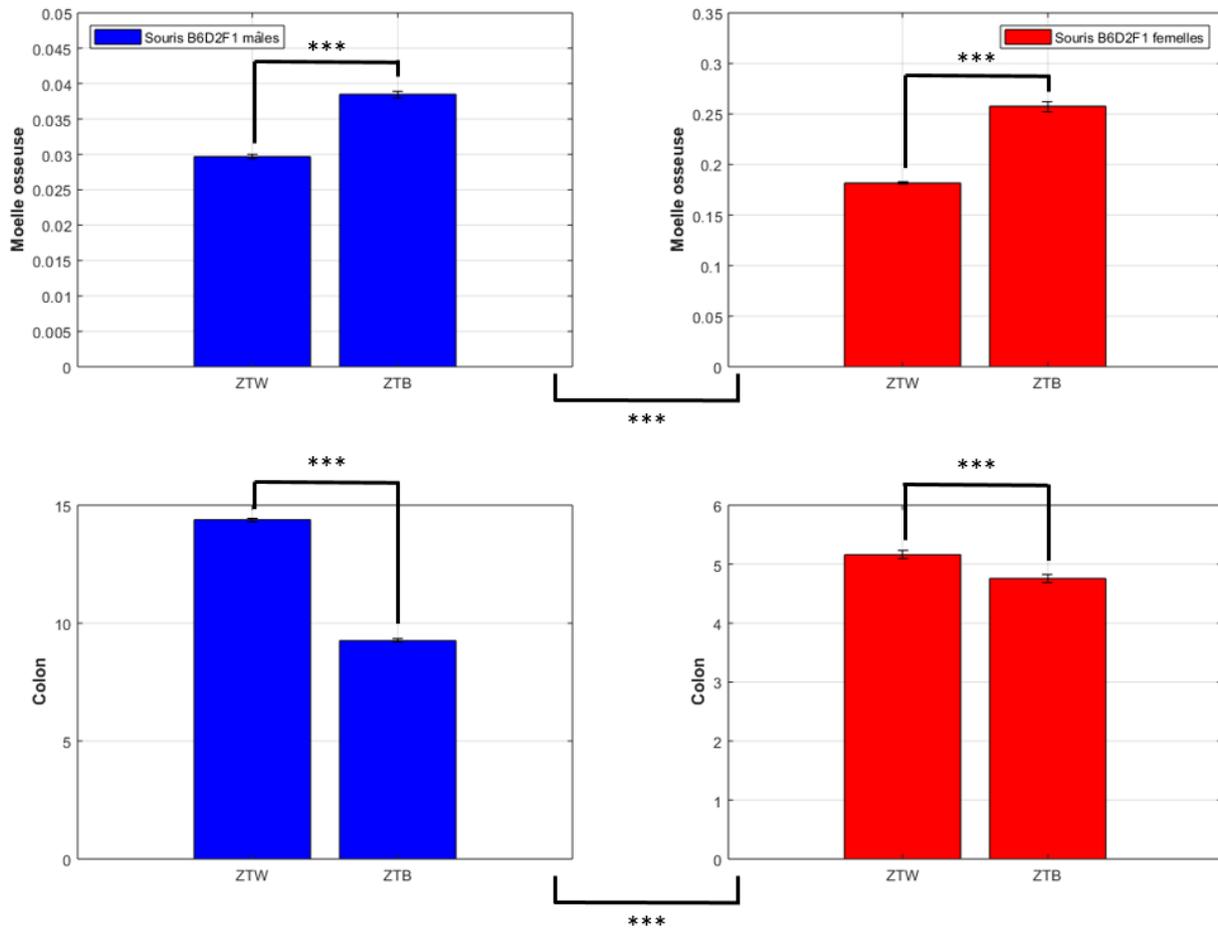


Figure 6 – Comparaison des AUC moyens du SN38 dans la moelle osseuse et le colon de souris B6D2F1 mâles et femelles injectées au ZTW et ZTB. Les AUC sont calculés à partir des données PK du SN38 dans la moelle osseuse et le colon des souris mâles (en bleu) et femelles (en rouge). Les AUC moyens sont calculés à partir de 6250 séries temporelles issues d’un produit cartésien entre 6 séries temporelles expérimentales mâles et femelles. Ces dernières ont été obtenues par deux expériences indépendantes de mesures de concentrations en SN38 à $t=30\text{min}$, 1h, 2h, 6h et 18h après injection de l’irinotecan distinctement à ZTW et ZTB (description des données en section 3.7.2. Chez les souris mâles : ZTW = 23h et ZTB = 11h. Chez les femelles : ZTW = 3h et ZTB = 15h. Une ANOVA à deux facteurs a mis en évidence des différences significatives en fonction du ZT d’injection et du sexe et l’interaction des deux, avec $p < 0.001$ (***)).

4.3 Formalisation et mises à jour du modèle PK-PD corps-entier de l’irinotecan chez la souris, à base d’EDO.

4.3.1 La pharmacocinétique

La première partie du modèle décrit les variations de concentration de l’irinotecan sous ses formes CPT11, SN38 et SN38G au cours du temps dans les compartiments suivants : le sang, la moelle osseuse, le colon, la lumière colique, le foie, les tissus non éliminant (NET) et la tumeur xénogreffée. Pour cela, je me suis basée sur une définition préexistante de la structure du modèle PK corps-entier, à base d’équations différentielles (EDO) [16]. Les

expressions des EDO représentent la somme des processus intervenant dans le transport et les réactions de biotransformations de l'irinotecan à l'échelle du corps-entier.

Le CPT11 est injecté par voie intraveineuse (IV) dans le sang. Dans le compartiment sanguin, il subit une première activation en SN38 via l'enzyme CES localisée dans les cellules sanguines. On considère également la bioactivation du médicament par CES dans le foie, la moelle osseuse, le colon et la tumeur (équation (10)). La détoxification du SN38 en SN38G prise en charge par l'enzyme UGT est active dans la moelle, le colon, le foie et la tumeur⁵ (équation (11)). Notons que le siège principal de détoxification du médicament est attribué au foie. En revanche, le sang n'intervient pas dans le processus de détoxification de l'irinotecan car l'enzyme UGT y est considérée comme inactive d'après [16].

$$C_{CES_organe} = \frac{V_{CES_organe}[CES][CPT11_{organe}]}{K_{CES_organe} + [CPT11_{organe}]} \quad (10)$$

avec organe = {sang, moelle osseuse, colon, foie, tumeur}

$$S_{UGT_organe} = \frac{V_{UGT_organe}[UGT][SN38_{organe}]}{K_{UGT_organe} + [SN38_{organe}]} \quad (11)$$

avec organe = {moelle osseuse, colon, foie, tumeur}

Répartis dans l'organisme via le système circulatoire, le CPT11, SN38 et SN38G diffusent passivement du sang vers les cellules de la moelle osseuse, du colon, du foie, du NET, de la tumeur et du NET [21]. A partir de ces organes, l'efflux du CPT11 est pris en charge par les transporteurs ABCB1 alors que l'efflux du SN38 et SN38G est pris en charge par les enzymes ABCG2. Le processus de diffusion simple de l'irinotecan à partir du compartiment sanguin est formalisé par 1^{ere} loi de Fick (équation (12) à (14)). Les mécanismes d'efflux vers le sang sont formalisés par une équation de Michaelis-Menten équations (24) à (26)), étant donné que les pompes à efflux du médicament sont classées en tant qu'enzymes michaeliennes [22].

L'irinotecan sous ses 3 formes est susceptible d'emprunter le cycle entéro-hépatique. Il s'agit du transport du médicament entre le colon, le foie et la lumière colique décrit en introduction. Le médicament est transporté du colon vers le foie via la veine porte. J'ai posé l'abstraction suivante : le trajet colon-foie est formalisé par un efflux direct du colon vers le foie. Ce dernier était considéré comme actif dans le modèle précédemment défini. J'ai décidé de procéder à une première modification des EDO d'après la motivation suivante: la répartition des pompes à efflux ABC est connue pour être polarisée dans les entérocytes [23]. Ainsi, sachant que les transporteurs ABCB1 et ABCG2 sont répartis principalement sur la membrane côté lumière et non sanguin, j'ai formalisé le trajet du colon vers le foie par une diffusion passive (équations (15), (18) et (21)). Ensuite, l'irinotecan est susceptible d'être transporté du foie vers la lumière colique *via* les voies biliaires. De nouveau j'ai modifié la formalisation de ce transport par rapport au modèle précédent. En effet, la répartition des pompes à efflux ABCB1 et ABCG2 est également polarisée dans les hépatocytes [23]. Sachant que ces pompes se situent principalement sur la membrane localisée côté

5. Le compartiment NET ne comporte ni de terme de bioactivation ni de détoxification car on considère qu'il représente uniquement un lieu de passage du médicament.

sang par rapport au côté bile, j'ai considéré le transport du foie vers lumière colique comme passif (équations (16), (19) et (22)), contrairement au modèle précédent qui le considérait comme actif. Enfin, le médicament est transporté de manière bilatérale entre le colon et la lumière colique. L'irinotecan efflue activement du colon vers la lumière (équations (27) à (29)) et est réabsorbé passivement par les entérocytes (équations (17), (20) et (23)).

L'élimination du médicament par les urines (qualifiée de clairance rénale) est formalisée par un flux passif à partir du compartiment sanguin (équations (30) à (32)). L'élimination par les fèces (la clairance intestinale) est quant à elle modélisée par un flux passif à partir de la lumière colique (équations (33) et (34)).

$$DC_{sang_organe} = k_{absCPT_organe}[CPT11_{sang}] \quad (12)$$

$$DS_{sang_organe} = k_{absSN_organe}[SN38_{sang}] \quad (13)$$

$$DG_{sang_organe} = k_{absSNG_organe}[SN38G_{sang}] \quad (14)$$

avec organe = {moelle osseuse, colon, foie, NET, tumeur}
et avec $C = CPT11$, $S = SN38$ et $G = SN38G$.

$$DC_{colon_foie} = k_{absCPT_foie}[CPT11_{colon}] \quad (15)$$

$$DC_{foie_lumiere} = k_{absCPT_lumiere}[CPT11_{foie}] \quad (16)$$

$$DC_{lumiere_colon} = k_{absCPT_colon}[CPT11_{lumiere}] \quad (17)$$

$$DS_{colon_foie} = k_{absSN_foie}[SN38_{colon}] \quad (18)$$

$$DS_{foie_lumiere} = k_{absSN_lumiere}[SN38_{foie}] \quad (19)$$

$$DS_{lumiere_colon} = k_{absSN_colon}[SN38_{lumiere}] \quad (20)$$

$$DG_{colon_foie} = k_{absSNG_foie}[SN38G_{colon}] \quad (21)$$

$$DG_{foie_lumiere} = k_{absSNG_lumiere}[SN38G_{foie}] \quad (22)$$

$$DG_{lumiere_colon} = k_{absSNG_colon}[SN38G_{lumiere}] \quad (23)$$

$$AC_{organe_sang} = \frac{V_{effCPT}[ABC B1_{organe_sang}][CPT11_{organe}]}{K_{effCPT} + [CPT11_{organe}]} \quad (24)$$

$$AS_{organe_sang} = \frac{V_{effSN}[ABC G2_{organe_sang}][SN38_{organe}]}{K_{effSN} + [SN38_{organe}]} \quad (25)$$

$$AG_{organe_sang} = \frac{V_{effSNG}[ABC G2_{organe_sang}][SN38G_{organe}]}{K_{effSNG} + [SN38G_{organe}]} \quad (26)$$

avec organe = {moelle osseuse, foie, NET, tumeur}

$$AC_{colon_lumiere} = \frac{V_{effCPT}[ABCB1_{colon_lumiere}][CPT11_{colon}]}{K_{effCPT} + [CPT11_{colon}]} \quad (27)$$

$$AS_{colon_lumiere} = \frac{V_{effSN}[ABCG2_{colon_lumiere}][SN38_{colon}]}{K_{effSN} + [SN38_{colon}]} \quad (28)$$

$$AG_{colon_lumiere} = \frac{V_{effSNG}[ABCG2_{colon_lumiere}][SN38G_{colon}]}{K_{effSNG} + [SN38G_{colon}]} \quad (29)$$

$$C_{clairance_renale} = k_{ren_CPT}[CPT11_{sang}] \quad (30)$$

$$S_{clairance_renale} = k_{ren_SN}[SN38_{sang}] \quad (31)$$

$$G_{clairance_renale} = k_{ren_SNG}[SN38G_{sang}] \quad (32)$$

$$C_{clairance_intestinale} = k_{int_CPT}[CPT11_{lumiere}] \quad (33)$$

$$S_{clairance_intestinale} = k_{int_SN}[SN38_{lumiere}] \quad (34)$$

4.3.2 La pharmacodynamique

La seconde partie du modèle formalise le mode d'action cytotoxique du médicament dans chaque compartiment du modèle corps-entier. L'irinotecan sous sa forme active est un inhibiteur de la TOP1 qui se lie spontanément au complexe ADN-TOP1 pour former le complexe réversible ADN-SN38 et TOP1. Cette réaction de complexation. Basée sur la loi d'action de masse, cette réaction est formalisée par une relation de proportionnalité entre la concentration en ADN, TOP1, SN38 et une constante de formation du complexe réversible notée K_{form} (équation (35)). La dissociation du complexe réversible est modélisée par une relation de proportionnalité entre le complexe lui-même et une constante de dissociation notée K_{diss} (équation (37)). Le complexe réversible se transforme en complexe irréversible dès lors qu'il rentre en collision avec la machinerie de réplication de la cellule. Lorsque qu'une cellule se trouve en phase de synthèse du cycle cellulaire (phase S), les fourches de réplication sont plus nombreuses ce qui augmente la probabilité de collision avec le complexe réversible. C'est pourquoi l'irinotecan est particulièrement toxique envers les tissus à forte prolifération (tumeur cancéreuse, colon et moelle osseuse). Aussi, la protéine cycline A est utilisée comme un marqueur de la phase S. Par conséquent j'ai formalisé la réaction de formation des complexes irréversibles par une relation de proportionnalité entre la concentration en complexe réversible, la protéine CycA et une constante de formation du

complexe irréversible notée K_{form2} (équation (36)).

La formation des complexes irréversibles est positivement corrélée à l'apoptose des cellules, comme démontré sur des cellules Caco-2 en culture [13]. Basé sur ce fait, je considère que le niveau de formation des complexes irréversibles simule la toxicité hématologique et intestinale respectivement dans la moelle osseuse et le colon (**Annexe 6.2 équations (67) et (68)**). La pharmacodynamie est modélisée dans tous les organes excepté le NET pour les mêmes raisons qu'expliquées dans la section précédente. Il en est de même pour le sang car on suppose que l'irinotecan agit sur les cellules sanguines au niveau de la moelle osseuse⁶.

$$S_{Compl_organe} = k_{form}[DNA_{organe}][TOP1_{organe}][SN38_{organe}] \quad (35)$$

avec $DNA_{organe} = [DNA_{total}] - [Compl] - [Icompl]$

$$S_{Irr_organe} = k_{form2}[Compl_{organe}][CycA_{organe}] \quad (36)$$

$$S_{Decompl_organe} = k_{diss}[Compl_{organe}] \quad (37)$$

avec organe = {moelle osseuse, colon, tumeur, foie}

Somme toute, le modèle PK-PD de l'irinotecan à l'échelle du corps-entier est formalisé par un système à compartiment à base 31 équations différentielles mécanistes. Les EDO s'expriment sous la forme d'une somme processus biologiques mis en équations ((10) à (37)) dans chaque organe (**annexe 6.2**).

4.3.3 Les rythmes circadiens des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan

Les rythmes circadiens des protéines intervenant dans le modèle PK-PD, à savoir CES, UGT, ABCB1, ABCG2, TOP1 et CYCA, sont formalisés par l'équation cosinor à *une* harmonique (équation (1)) dans les organes où elles interviennent excepté le colon et le foie. Dans ces organes, l'équation cosinor utilisée est décomposée de *deux* harmoniques (équation (2)) dont les paramètres sont estimés à partir de données biologiques (**section 4.1**).

4.3.4 Les paramètres fixés

Le modèle PK-PD corps-entier comporte une centaine de paramètres dont les valeurs nécessitent d'être estimées. J'ai fixé certains de ces paramètres en amont de l'étape d'estimation des paramètres. C'est notamment le cas des paramètres de PD (K_{form} , K_{form2} et K_{diss}) dont les valeurs sont fixées d'après une modélisation de la PD sur des cellules Caco-2 en culture. Aussi, j'ai supposé ces paramètres égaux dans chaque organe par hypothèse de simplification⁷. Toujours par abstraction, j'ai supposé que les constantes d'affinités des

6. Notons que la moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse.

7. Cette hypothèse de simplification se base sur le principe de parcimonie aussi nommé le rasoir d'ockham. Ce principe prône qu'une pluralité ne doit pas être posée sans nécessité. Ainsi pour une première approche, les hypothèses de modélisation les plus simples sont privilégiées.

enzymes michaeliennes (Km) sont égales à celles déterminées chez les cellules Caco-2, et égales entre les différents organes du modèle. En second lieu, j’ai fixé les volumes des différents organes du modèle distinctement pour les souris mâles et femelles, d’après la littérature. Enfin, j’ai fixé les valeurs des paramètres circadiens estimés en **section 4.1**. L’ensemble des paramètres fixés pour les souris mâles et femelles ainsi que les références bibliographiques des données utilisées pour la fixation des paramètres sont regroupés en **annexe 6.4**.

4.3.5 L’état initial du système

L’état initial du système est défini comme suit : l’irinotecan est injecté dans le sang veineux des souris B6D2F1 à une dose de 50mg/kg à des souris B6D2F1 avec une masse et un volume du sang moyen estimés respectivement à **26.7g** et **1.56mL** pour les mâles, et **18.9g** et **1.1mL** pour les femelles [16] [15] [24]. La concentration initiale en CPT11 est par conséquent fixée à $1262\mu\text{M}$ à $t=0$. Les autres variables du système d’EDO sont fixées à 0.

4.4 Estimation des paramètres du modèle PK-PD pour les souris B6D2F1 mâles

L’exploration exhaustive de l’ensemble des valeurs réelles que peuvent prendre les paramètres du modèle PK-PD est techniquement impossible. En effet, il existe dans ce cas une infinité de valeurs possibles pour chacun des paramètres et aucun ordinateur n’a suffisamment de puissance de calcul pour réaliser cette tâche. Ainsi dans le but de trouver des valeurs des paramètres du modèle qui reproduisent fidèlement les données PK-PD observées expérimentalement chez la souris, j’ai appliqué une méthode d’estimation des paramètres par les moindres carrés améliorés dont la fonction coût a été minimisée par l’algorithme génétique CMAES (**section 3.6**). Pour ce faire, je disposais de données PK expérimentales du CPT11 et SN38 dans le sang, la moelle osseuse, le colon, le foie et la tumeur xénogreffée de souris B6D2F1 mâles et femelles (**section 3.7.2**). Le CPT11 et SN38 ont été mesuré après injection dans deux groupes indépendants ZTB et ZTW. Cette section se concentre sur les résultats d’estimation des paramètres du modèle PK-PD des souris mâles et la comparaison entre les données PK simulées et les données PK expérimentales du CPT11 et du SN38 (**figures 7 et 8**). Notons que la concentration en SN38 représentée en figure 8 correspond ici à la fraction totale du SN38, c’est-à-dire à la somme du SN38 libre et du SN38 associé aux complexes réversibles et irréversibles.

Le modèle des souris mâles, calibré à partir de ces paramètres, reproduit très fidèlement les données PK expérimentales du CPT11 dans tous les organes exceptés dans la moelle osseuse où sa concentration est sous-évaluée à ZTW (ZT23). Le modèle reproduit également de manière fidèle la cinétique du SN38 dans le foie, la moelle osseuse et la tumeur. En revanche par rapport aux données expérimentales, sa concentration est surévaluée par le modèle dans le compartiment sanguin tandis qu’elle est sous-estimée dans le colon, à ZTW (ZT23). Comme décrit dans la littérature, l’enzyme responsable de la bioactivation du CPT11 (CES) est très active dans le foie. Il en est de même pour l’enzyme responsable de la détoxification du SN38 (UGT) [13] [15]. Notons que d’après le modèle, l’enzyme CES semblent également très active dans le compartiment sanguin et à l’opposé quasiment inactive dans le colon. Quant à la détoxification du SN38, elle est estimée très active dans la moelle osseuse alors qu’elle est estimée plus faiblement active dans la tumeur et le colon.

D'un point de vue numérique, une estimation des paramètres PK-PD mâles, qui utilise l'algorithme de minimisation CMAES, varie entre 15h et 30h selon la définition de la taille de l'intervalle de recherche des paramètres.

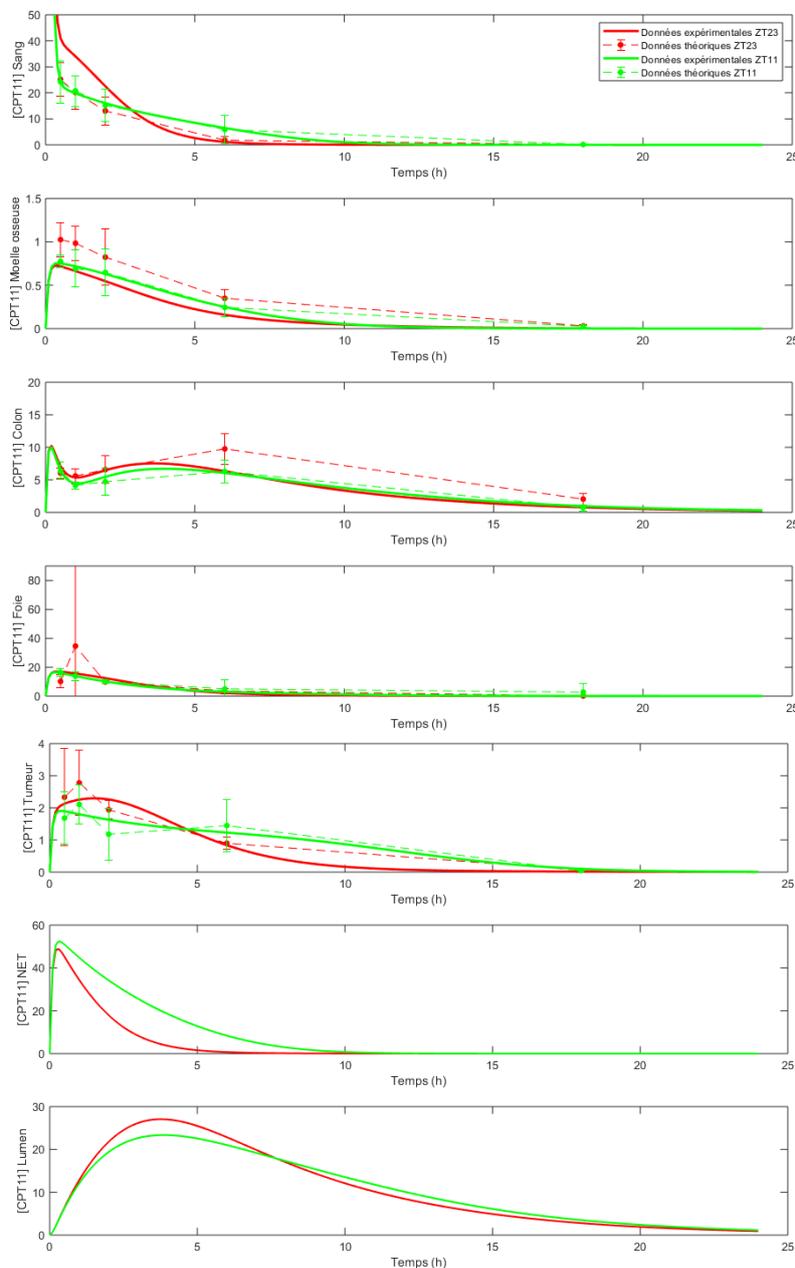


Figure 7 – Estimation numérique de la pharmacocinétique du CPT11 chez les souris B6D2F1 mâles après injection du CPT11 à ZT23 (rouge) et ZT11 (vert), à partir du modèle PK-PD corps-entier. Chaque point correspond à la concentration moyenne du CPT11 en μM (+SEM avec $n = 5$). Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement du modèle PK-PD aux données expérimentales PK mâles (décrites en section 3.7.2).

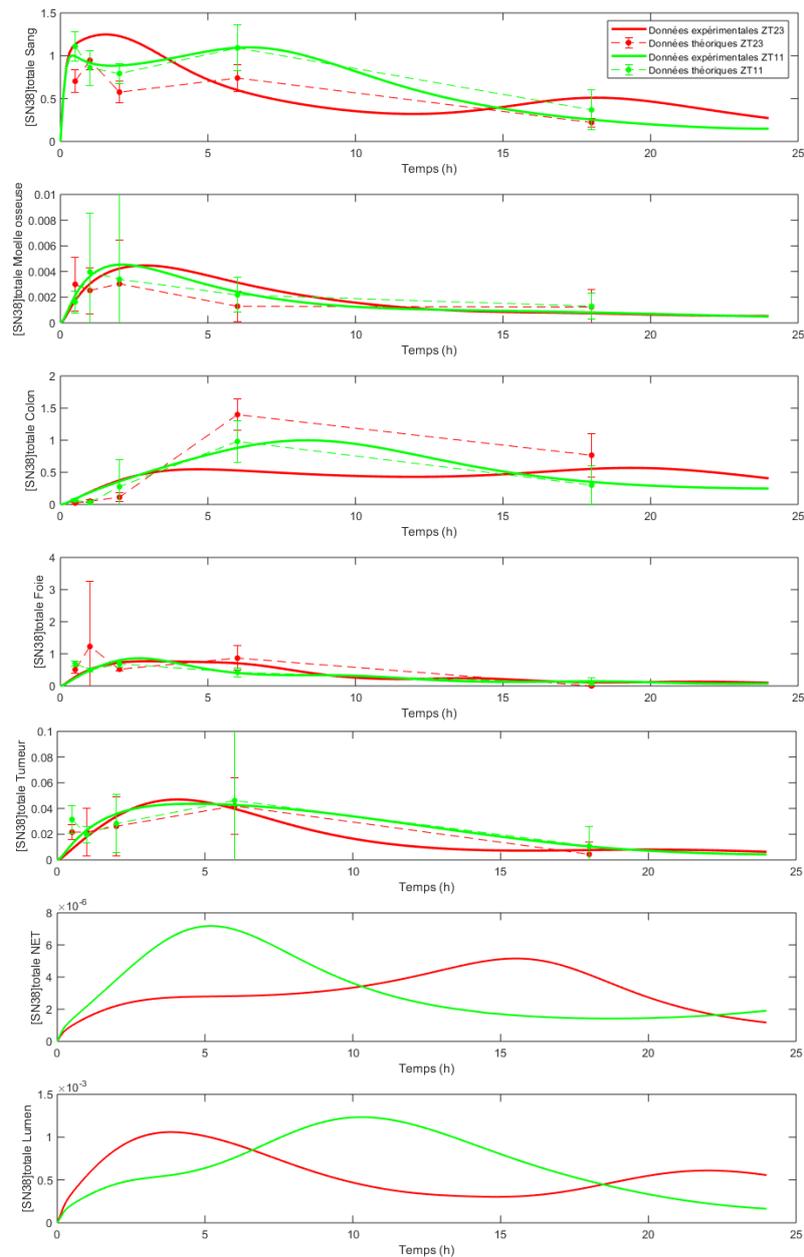


Figure 8 – Estimation numérique de la pharmacocinétique du SN38 chez les souris B6D2F1 mâles après injection du CPT11 à ZT23 (rouge) et Z11 (vert), à partir du modèle PK-PD corps-entier. Chaque point correspond à la concentration moyenne du SN38 en μM ($+SEM$ avec $n = 5$). Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement du modèle PK-PD aux données expérimentales PK mâles (décrites en section 3.7.2).

4.5 Simulation de la chronotoxicité hématologique et intestinale des souris B6D2F1 mâles.

4.5.1 Mise en place d'une l'expérience *in silico*

A partir du modèle PK-PD mâle calibré chez les souris mâles, j'ai réalisé l'expérience *in silico* suivante : J'ai simulé 240 heures d'injections du médicament (variant de ZT0 à

ZT24) et calculé numériquement pour chaque ZT les toxicités hématologiques et intestinales théoriques 24h après injection. Les toxicités théoriques ont été calculées via la résolution numérique des équations (67) et (68), qui correspondent à la variation de la concentration du complexe irréversible au cours du temps. En effet, il a été expérimentalement démontré que cette quantité est corrélée à la cytotoxicité du médicament à la fois en contexte in vitro et in vivo [21].

4.5.2 Chronotoxicités théoriques dans le colon et la moelle osseuse de souris B6D2F1 mâles

A la fin de la simulation, on observe chez les souris mâles une toxicité hématologique et intestinale rythmique sur 24h (**figure 9**). La chronotoxicité circadienne a été modélisée avec succès chez les souris mâles. En outre, on remarque que la quantité de SN38 lié à l'ADN est plus élevée d'un facteur 100 dans le colon par rapport à la moelle. Sachant que cette quantité est corrélée positivement à l'apoptose des cellules, le modèle montre que les cellules du colon seraient en théorie plus enclines à déclencher une apoptose que les cellules de la moelle chez les souris mâles. Contrairement aux résultats expérimentaux, les résultats théoriques indiquent que la toxicité intestinale après injection à ZTB (ZT11) est inférieure à celle calculée pour une injection à ZTW (ZT23). Ce résultat peut éventuellement être expliqué par la sous-estimation de la concentration du SN38 dans le colon à ZT23, par le modèle PK-PD mâle. A l'opposé, le résultat de la simulation de la toxicité hématologique est cohérent par rapport aux données expérimentales car la toxicité induite après injection du médicament à ZTB est inférieure à celle induite après injection à ZTW [25]. Néanmoins, cette différence est faible comparé aux données expérimentales qui l'évalue à un facteur 2.

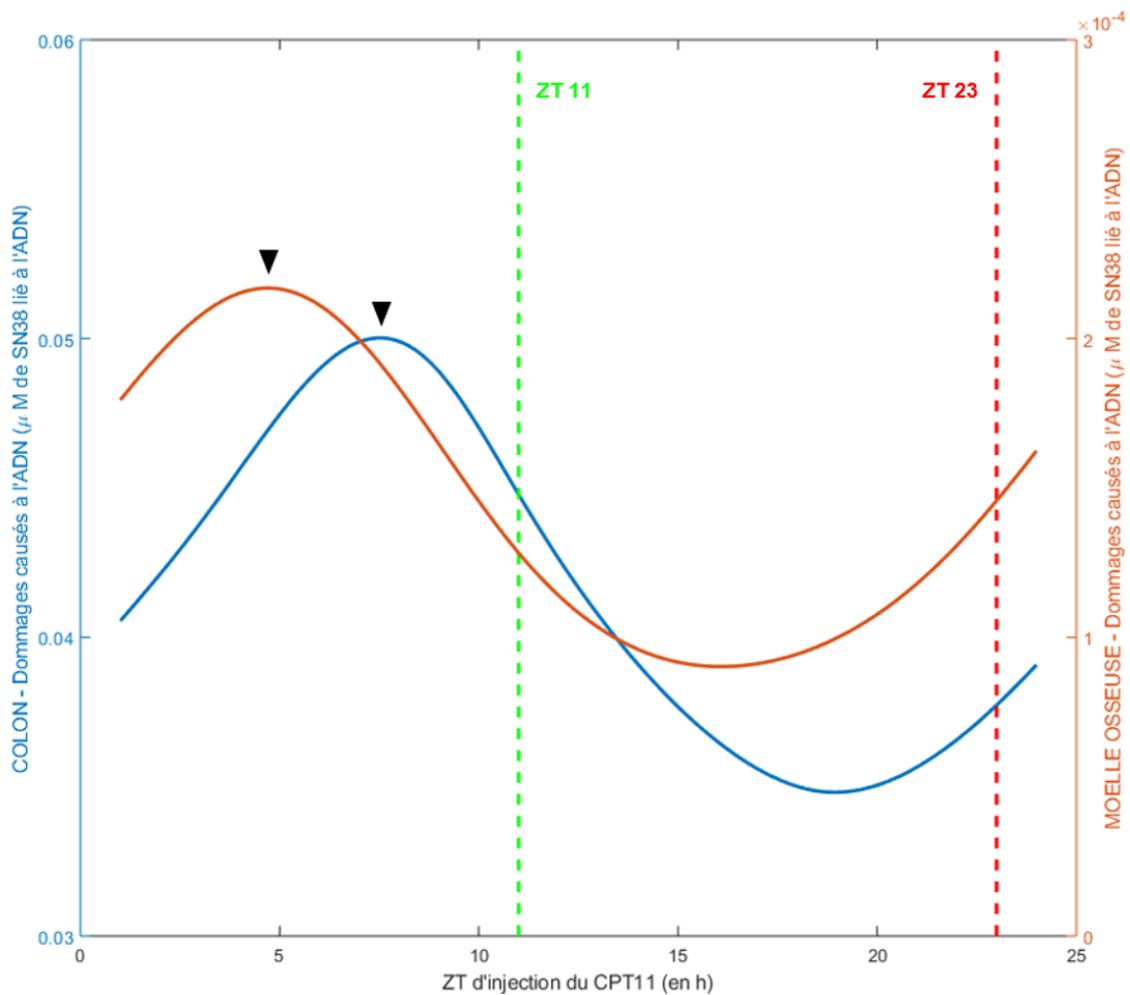


Figure 9 – **Simulation de la chronotoxicité intestinales (bleu) et hématologique (orange) à partir du modèle PK-PD mâle.** Les abscisses représentent 240 ZT d'injection variant de ZT0 à ZT24. L'axe des ordonnées représente la valeur de la somme des variables $Compl + Icompl$ du modèle PK-PD, 24h après injection. Les ZT d'injection ZT11 (vert) et ZT23 (rouge) correspondent respectivement à l'heure de meilleure et pire tolérabilité de l'irinotecan déterminées *expérimentalement* chez les souris B6D2F1 mâles d'après [11]. Les flèches noires indiquent les pics de toxicité de l'irinotecan calculés numériquement.

4.6 Estimation *préliminaire* des paramètres du modèle PK-PD chez les souris B6D2F1 femelles et simulation *préliminaire* de leur chronotoxicité hématologique et intestinale.

Les procédures d'estimation des paramètres PK-PD ainsi que celles de simulation de la chronotoxicités hématologique et intestinale ont été renouvelées mais cette fois dans l'intention de calibrer le modèle PK-PD des souris B6D2F1 femelles. Concernant cette classe de souris, je propose uniquement des résultats de modélisation préliminaires dans la mesure où la paramétrisation du modèle PK-PD femelle nécessiterait d'être d'avantage explorée par l'algorithme CMAES afin de représenter fidèlement les données expérimentales. Ces résultats préliminaires sont disponibles en **annexe 6.5 et 6.6**.

5 Discussion et perspectives

Mon travail de stage a permis de modéliser les mécanismes intervenant dans la pharmacocinétique de l'irinotecan (PK), sa pharmacodynamique (PD) mais également la chronotoxicité intestinale et hématologique distinctement chez des souris B6D2F1 mâles et femelles. Deux ensembles de données expérimentales étaient disponibles. D'une part, les séries temporelles des protéines intervenant dans la pharmacologie de l'irinotecan dans le colon et le foie de souris mâles et femelles. D'autre part, l'évolution des concentrations de l'irinotecan (CPT11, SN38 et SN38G) dans plusieurs organes de souris mâles et femelles après injection à deux heures différentes : ZTB (heure de meilleure tolérance) et ZTW (heure de pire tolérance). Ces données expérimentales ont été utilisées afin d'explorer la question de la spécificité au sexe de la chronotoxicité de l'irinotecan dans une première partie et dans le but de paramétrer le modèle PK-PD distinctement chez les souris mâles et femelles dans une seconde partie.

5.1 Exploration des données expérimentales mâles et femelles à disposition

Mesurés expérimentalement à partir de souris B6D2F1 mâles et femelles, les rythmes des protéines impliquées dans le transport et les biotransformations du médicament dans le colon et le foie ont été analysés en amont du processus de modélisation à l'aide du logiciel Circa Fourier. Ce programme que j'ai conçu dans le cadre du stage, permet de tester et modéliser le rythme circadien n'importe quelle série temporelle expérimentale en entrée en utilisant une équation cosinor à une ou deux harmoniques. Ce logiciel a permis de mettre en évidence une différence dans les rythmes de ces protéines selon le sexe des souris. Je me suis focalisée sur un des organes cible de la toxicité du médicament : le colon. Dans le colon de souris mâles, les enzymes impliquées dans la bioactivation (CES) et la détoxification de l'irinotecan (UGT) sont les deux seules protéines qui présentent une rythmicité (respectivement ultradienne et circadienne) parmi l'ensemble des protéines testées. Ce résultat coïncide avec une étude sur des cellules de colon (Caco-2). En effet, cette étude montre que les enzymes CES et UGT influencent de manière prépondérante les dommages causés à l'ADN des cellules coliques, à l'aide d'une analyse de sensibilité sur le modèle PK-PD cellulaire [14]. Ces résultats mis bout à bout suggèrent que les enzymes CES et UGT détermineraient principalement la chronotoxicité de l'irinotecan dans le colon de souris mâles. Néanmoins, cette hypothèse demanderait à être confirmée *via* une analyse de sensibilité à partir du modèle PK-PD corps-entier calibré chez les souris mâles. En ce qui concerne le colon de souris femelles, ce sont les pompes à efflux (ABCB1) et le marqueur de la phase de synthèse du cycle cellulaire (CYCA) qui présentent une rythmicité ultradienne (sur 12h). Contrairement aux souris mâles, les enzymes CES et UGT sont arythmiques dans le colon des souris femelles et ce qui suggère qu'elles ne participeraient pas à la chronotoxicité intestinale de l'irinotecan. De nouveau, cette hypothèse nécessiterait d'être d'avantage explorée notamment *via* une analyse de sensibilité en utilisant cette fois le modèle PK-PD corps-entier calibré chez les souris femelles.

L'analyse des données PK du SN38 dans les organes cibles de toxicité (colon et moelle osseuse) indique que ces organes ne sont pas exposés à la même concentration de SN38 durant les 18h qui suivent l'injection du médicament selon si la souris est un mâle ou une femelle. Ce résultat pourrait être expliqué par une activité spécifique au sexe des protéines impliquées dans la pharmacologie de l'irinotecan, notamment mis en évidence

dans le paragraphe précédent.

5.2 Critique du modèle PK-PD calibré chez les souris B6D2F1 mâles

Le modèle qui décrit la pharmacologie de l'irinotecan à l'échelle du corps-entier a été mis à jour au niveau de sa structure à base d'équations différentielles ordinaires. Ce modèle calibré sur des souris mâles reproduit de manière cohérente les données PK du CPT11. En revanche, l'approximation numérique des données PK du SN38, le métabolite actif du médicament, est peu satisfaisante chez les souris mâles. En effet, la concentration en SN38 est sous estimée dans le colon ce qui se répercute sur la simulation de la chronotoxicité dans cet organe qui ne reproduit pas les données expérimentales. La toxicité intestinale calculée numériquement à ZTB est supérieure à celle calculée à ZTW ce qui contredit les données expérimentales [25] qui indiquent que la toxicité dans le colon est deux fois plus élevée à ZTW par rapport à ZTB. En outre, la toxicité intestinale calculée numériquement à ZTB est inférieure à celle calculée à ZTW ce qui correspond qualitativement aux données expérimentales [25]. Cependant qualitativement la différence entre les deux ZT est sous-estimée numériquement. Ces résultats montrent la nécessité de modifier de nouveau la structure du modèle PK-PD et/ou continuer à explorer l'espace des paramétrisations possibles jusqu'à obtenir des résultats pleinement cohérents par rapport aux connaissances biologiques. Il a été démontré expérimentalement que la forme désactivée du médicament (SN38G) est capable d'être réactivée en SN38 par la β glucoronidase, une enzyme bactérienne principalement localisée dans la lumière colique [26] [13]. Ainsi, une première modification du modèle consisterait à ajouter une variable β glucoronidase dans la lumière du colon, ce qui ajouterait un terme de synthèse de SN38 dans un compartiment où il est numériquement sous-estimé.

5.3 Perspectives en modélisation

5.3.1 Calibration du modèle PK-PD femelle

Une perspective à court terme consisterait à poursuivre l'estimation des paramètres du modèle PK-PD pour les souris B6D2F1 femelles, jusqu'à obtenir une modélisation pleinement cohérente avec les données expérimentales.

5.3.2 Enrichissement de la méthode des moindres carrés par la méthode de Monte Carlo

Les paramètres PK-PD ont été estimés à partir de données PK expérimentales (CPT11, SN38 et SN38G) en utilisant la méthode des moindres carrés améliorés. Cette méthode présente l'inconvénient majeur de ne pas tenir compte de la variance des données expérimentales. Une méthode alternative consisterait à appliquer la méthode des moindres carrés améliorées telle qu'elle est définie dans ce rapport, mais sur des données expérimentales transformées. La transformation se base sur la méthode de *Monte Carlo* suivante :

À partir de P données expérimentales, notées x_j avec $j = 1, \dots, P$, mesurées à N points de temps, notés t_i avec $i = 1, \dots, N$, un ensemble de K données expérimentales "fictives" sont générées après un rééchantillonnage *aléatoire* à partir des P données expérimentales. Pour ce faire, on émet l'hypothèse que chaque point expérimental suit une loi normale de paramètres μ et σ définis par :

$$\mu_i = \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P x_j \text{ et } \sigma_i = \sqrt{\frac{1}{P-1} \sum_{j=1}^P (x_j - \mu)^2}$$

À partir de chacun des points x_i qui suivent une loi $\mathcal{N}(\mu_i, \sigma_i)$, on générera aléatoirement K valeurs "fictives" appartenant à l'ensemble des valeurs réelles qui suivent cette loi. Ensuite, la méthode des moindres carrés améliorées sera appliquée sur ces données "fictives" pour paramétrer un modèle PK-PD autant de fois que le nombre d'échantillons "fictifs" de taille K générés par la méthode de Monte Carlo. Enfin, une moyenne et une variance seront calculées pour chacun des paramètres du modèle PK-PD et mesureront la fiabilité de l'estimation des paramètres.

Dans le cadre de ce stage, cette méthode n'a pas pu être mise en pratique l'étape qui consiste à utiliser l'algorithme CMAES pour minimiser la fonction de coût déterminées par la méthode des moindres carrés utilise une ressource temps inabordable à l'échelle d'un stage de master 2⁸.

5.3.3 Identification des déterminants circadiens spécifiques de la chronotoxicité par analyse de sensibilité

La perspective à long terme du projet de stage consistera à utiliser les simulations numériques de la chronotoxicité intestinale et hématologique de l'irinotecan afin de réaliser une analyse de sensibilité basée sur une décomposition de la variance (indices de Sobol). Cette analyse de sensibilité consistera à quantifier l'impact de la variabilité des paramètres circadiens du modèle sur la toxicité intestinale et hématologique. Cette analyse de sensibilité mettra en évidence les principaux déterminants circadiens des chronotoxicités simulées numériquement distinctement chez les souris B6D2F1 mâles et femelles. Ces résultats indiqueront quels paramètres du modèle PK-PD étudier expérimentalement en priorité afin d'éclaircir le champs des connaissances sur les mécanismes moléculaires responsable de la chronotoxicité de l'irinotecan spécifique au sexe. Une piste consisterait à étudier particulièrement le lien entre les paramètres circadiens mis en évidence par l'analyse de sensibilité d'un côté, et les hormones sexuelles de l'autre.

5.4 Perspectives en recherches cliniques dans le cadre de la chronothérapie des cancers

La structure compartimentale du modèle PK-PD corps-entier, a été conçue de manière générique chez les mammifères, c'est à dire que l'on suppose que sa structure reste la même quel que soit le mammifère étudié. Cette généricité permet d'envisager une adaptation de ce modèle de la souris à l'Homme qui se baserait principalement sur un redimensionnement des valeurs des paramètres PK-PD. Redimensionner le modèle souris mâle et femelle en un modèle patient respectivement de sexe masculin et féminin permettrait de s'affranchir des procédures invasives telles que des biopsies de foie, colon, moelle osseuse, tumeur ou de peau. À partir du modèle PK-PD souris il suffirait de paramétrer le modèle chez les mâles et les femelles, de le valider expérimentalement et de transposer la paramétrisation distinctement chez des patients de sexe masculin et féminin. À partir du modèle PK-PD *patient*, la procédure consisterait à déterminer les heures d'injection du médicament anticancéreux pour lesquelles les toxicités intestinales et hématologiques sont minimales, spécifiquement selon le sexe du patient. Il a été démontré dans des expériences sur des cellules Caco-2, que l'heure d'injection correspondant à l'heure de meilleure tolérabilité de l'irinotecan, correspond également à l'heure de meilleure efficacité envers les cellules cancéreuses [14]. En émettant l'hypothèse que ce résultat est vérifié cliniquement, une

8. En guise d'exemple, considérons 50 rééchantillonnages par la méthode de Monte Carlo définie ici. Sachant qu'une estimation de paramètres nécessite 25h de calcul en moyenne, une seule procédure de Monte Carlo nécessiterait 13 jours de calculs parallélisés sur les 4 coeurs d'un processeur *IntelCorei7*.

chimiothérapie chronomodulée à partir de modèles PK-PD de l'irinotecan calibré selon le sexe du patient permettrait de minimiser la toxicité du médicament envers les tissus sains tout en maximisant l'efficacité antitumorale du médicament. Cette étape constitue la première démarche dans la personnalisation des chronothérapies cancéreuses notamment pour l'irinotecan mais également pour d'autres médicaments anticancéreux comme l'oxaliplatine pour lequel des travaux à l'interface entre biologie et mathématiques sont en cours au laboratoire [27].

References

- [1] Lévi F., Ballesta A., Dulong S., Innominato PF., and Clairambault J. Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50:377–421, 2010.
- [2] Levi F. and Schibler U. Circadian rhythms : mechanism and therapeutics implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:593–628, 2007.
- [3] Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews Genetics*, 18(3):164–179, 2017. doi:10.1038/nrg.2016.150.
- [4] Yoo SH., Yamazaki S., Lowrey PL., Shimomura K., Ko CH., Burh ED., Siepkas SM., Hong HK., Oh WJ., Yoo OJ., Menaker M., and Takahashi JS. Period2::luciferase real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15):5335–5346, 2004. doi:10.1073/pnas.0308709101.
- [5] Ishida A., Mutoh J., Ueyama T., Bando H., Masubuchi S., Nakahara D., and Okamura H. Tsujimoto G. Light activates the adrenal gland : timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab*, 2(5):297–307, 2005. doi:10.1038/nrg.2016.150.
- [6] Buhr ED., Yoo SH., and Takahashi JS. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002):379–385, 2010. doi:10.1126/science.1195262.
- [7] Zhang R., Lahens NF., Ballance HI, Hughes ME, and Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals : implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45):16219–16224, 2014.
- [8] Koike N., Yoo SH., Huang HC., Kumar V., Lee C., Kim TK., and Takahashi JS. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 338(6105):349–354, 2012. doi:10.1126/science.1226339.
- [9] Blanke CD., Haller DG., Benson AB., Rothenberg ML., Berlin J., Mori M., Hsieh YC., and Miller LL. A phase II study of irinotecan with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated gastric adenocarcinoma. *Annals of Oncology*, 11:1575–1580, 2001.
- [10] Équipe de Franck Delaunay. Organisation de base du système circadien chez les mammifères. <http://ibv.unice.fr/FR/equipe/delaunay.php>.
- [11] Li XM., Mohammad-Diafari A., Dumitru M., Dulong S., Filipiski E., Siffroi-Fernandez S., Mteyrek A., Scaglione F., Guettier C., and Delaunay F. A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy. *Cancer Res*, 73:7176–7188, 2013.
- [12] Lévi F., Garufi C., Karaboué A., Focan C., Chollet P., Li XM., and Innominato P. Poster session. *Annals of Oncology*, 2017. 28 : v158-v208. 10.1093/annonc/mdx393.
- [13] Ballesta A., Dulong S., Abbara C., Cohen B., Okyar A., Clairambault J., and Lévi F. A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery. *PLoS Comput Biol*, 73:7176–7188, 2011. e1002143.

- [14] Dulong S., Ballesta Z., Okyar A., and Lévi F. A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery. *Mol Cancer Ther*, 14:2154–2164, 2015.
- [15] Ahowesso C. Approche expérimentale de la personnalisation de la chronothérapie par irinotecan. *Thèse*, 2011. Université Paris 11. 257 p.
- [16] Ballesta A., Clairambault J., Dulong S., and Lévi F. A systems biomedicine approach for chronotherapeutics optimization: focus on the anticancer drug irinotecan in new challenges for cancer systems biomedicine. *Springer*, (D’Onofrio A. and Cerrai P. and Gandolfi A. eds):pp 301–328, 2012. Milan.
- [17] David Rand and Annabelle Ballesta. Introduction to systems biology part 2. introduction to modelling of molecular networks. *University of Warwick - Systems Biology Centre*, 2017.
- [18] J Keener and J Sneyd. Mathematical physiology. *Inter. Appl. Math.*, Math. Bio.
- [19] Hansen N. The cma evolution strategy : a comparing review. towards a new evolutionary computation. advances on estimation of distribution algorithms. *Springer*, pages 75–102, 2006.
- [20] Okyar Alper, Filipku Elisabeth, Piccolo Enza, Ozturk Narin, Xandri-Monje Helena, Pala Zeliha, Abraham Kristin, gato de Jesus Gomes Ana Rita, Orman Mehmet, Xiao-Mei Li, Dallmann Robert, Lévi Francis, and Ballesta Annabelle. Sex-specific circadian activity of p-gp: a mechanistic study. *Can. Res.*, 2018. En cours de soumission.
- [21] Ballesta A. Approche combinée expérimentale et mathématique pour la personnalisation sur base moléculaire des thérapies anticancéreuses standards et chronomodulée. *Thèse*, 2011. Université Paris 11. p59.
- [22] Woebking B., Reuter G., Shilling RA., Velamakanni S., Shahi S., Venter H., Balakrishnan L., and van Veen HW. Drug-lipid a interactions on the escherichia coli abc transporter msba. *Journal of Bacteriology*, 187(18):6363–6369, 2005.
- [23] Russel FGM. Transporters: Importance in drug absorption, distribution, and removal. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2010. doi 10.1007/978-1-4419-0840-72.
- [24] Davies B. and Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 10(7):1093–1095, 1993.
- [25] Ahowesso C., Li X.M, and Lévi F. Approche expérimentale de la personnalisation de la chronothérapie par irinotécan. 2010.
- [26] Tobin P., Clarke S., and Seale JP. Lee S. Solomon M. The in vitro metabolism of irinotecan (cpt11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. *Clin Pharmacol*, 62:122–129, 2006.
- [27] Ballesta A., Innominato PF., Dallmann R., Rand A., and Lévi F. Systems chronotherapeutics. *Pharm Rev*, 69(2):161–199, 2017. doi:10.1124/pr.116.013441.
- [28] Harald Goldstein. Introduction to f-testing in linear regression models. *Lecture Note*, 2013. Department of economics. University of Oslo.

- [29] Durbin PW., Jeung N., Kullgreen B., and Clemons GK. Gross composition and plasma and extracellular water volumes of tissues of a reference mouse. *Health Phys.*, 63(4):427–442, 1992.
- [30] Ogliolda L., Wanke R., Rootmann O., Hermanns W., and Wolf E. Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. *Anat Rec.*, 250(3):292–299, 1998.
- [31] Sohlenius-Sternbeck AK. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. *Toxicol In Vitro.*, 20(8):1582–1586, 2006. doi: 10.1016/j.tiv.2006.06.003.
- [32] Marino DJ. Age-specific absolute and relative organ weight distributions for b6c3f1 mice. *J Toxicol Environ Health A.*, 75(2):76–99, 2012. doi: 10.1080/15287394.2011.625548.

6 Annexes

6.1 Le logiciel *Circa Fourier*

Au cours de mon stage, j'ai conçu en *matlab* le programme générique baptisé *Circa Fourier*. Il est capable de tester statistiquement puis de déterminer le « meilleur » ajustement du rythme circadien de n'importe quelle série temporelle par une équation cosinor à 1 ou 2 harmoniques. Dans ce paragraphe, je ne décrirai que brièvement le principe général du programme et fournirai un exemple en guise d'illustration.

Circa Fourier est structuré en 3 parties principales. La première partie se consacre à l'estimation des 5 paramètres, par la méthode des moindres carrés ordinaires, de l'équation cosinor à 2 harmoniques représentée ci-dessous (décrite en section) :

$$\begin{aligned} \text{proteine}(t) = M \times (1 + (A24 \times \cos\left[\frac{2\pi}{24} \times (t - \phi24)\right]) \\ + (A12 \times \cos\left[\frac{2\pi}{12} \times (t - \phi12)\right])) \end{aligned} \quad (38)$$

On qualifie cette équation de *modèle entier*. Trois estimations sont ensuite réalisées sur les modèles qualifiés de *modèle 24*, *modèle 12* et *modèle NULL*. Ces derniers sont qualifiés de modèles réduits car les ensembles des paramètres $\{A12\}$, $\{A24\}$ et $\{A24 \wedge A12\}$ sont fixés à zéro respectivement dans le modèle 24, modèle 12 et le modèle NULL. Ainsi, les modèles 24 et 12 comportent 3 paramètres (respectivement $\{M, A24, \phi24\}$, $\{M, A12, \phi12\}$ et le modèle NULL comporte 1 seul paramètre à estimer ($\{M\}$). À partir du modèle entier, modèle 24, modèle 12 et modèle NULL, la seconde partie du programme consiste à réaliser des tests F deux à deux comme suit : Entier *versus* NULL, Entier *versus* 24, Entier *versus* 12, 24 *versus* NULL et 12 *versus* NULL. Dans ce contexte de régression, le test de Fisher (test F) teste la significativité des amplitudes par rapport à une amplitude nulle mais également la significativité des harmoniques, par rapport à un seuil α donné par l'utilisateur. Pour ce faire, on définit en premier lieu la statistique de Fisher noté F :

$$F = \frac{\left(\frac{SSE_{\text{modele_reduit}} - SSE_{\text{modele_entier}}}{k-p}\right)}{\left(\frac{SSE_{\text{modele_entier}}}{n-k-1}\right)} \quad (39)$$

Avec :

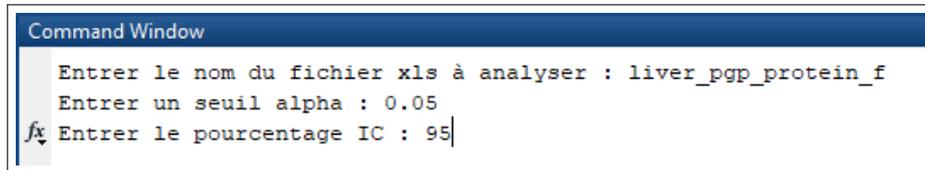
- SSE : la somme des erreurs entre données expérimentales et données prédites par le modèle testé,
- n : le nombre de données expérimentales, k : le nombre de paramètre du modèle entier,
- p : le nombre de paramètre du modèle réduit sachant que $k > p$.

On pose l'hypothèse nulle suivante : le modèle entier n'ajuste pas mieux les données que le modèle réduit. Ensuite, sous réserve de la normalité de la distribution des données expérimentales et de leur homoscedasticité, on admet que F suit une loi de Fisher de paramètres $k - p$ et $n - k - 1$. À partir de la fonction de répartition de cette loi, on

détermine la p-value du test qui correspond à la probabilité d'accepter l'hypothèse nulle (H_0). Si la p-value est inférieure au seuil α choisi, on rejette H_0 . Sachant que l'on réalise 5 tests F, on obtient 5 p-values correspondantes. Ces tests sont les suivants :

- Modèle entier *versus* modèle NULL,
- Modèle entier *versus* modèle 24,
- Modèle entier *versus* modèle 12,
- Modèle 24 *versus* NULL,
- Modèle 12 *versus* NULL,

Ces tests sont adaptés de [28]. Les figures suivantes illustrent les entrées utilisateurs (figure 1) ainsi que les résultats obtenus après exécution du programme (figures 2 et 3).



```
Command Window
Entrer le nom du fichier xls à analyser : liver_pgp_protein_f
Entrer un seuil alpha : 0.05
fx Entrer le pourcentage IC : 95
```

Figure 1 – Les entrées utilisateurs du programme *Circa Fourier*

Les entrées utilisateurs. Après exécution du programme, l'utilisateur a la possibilité de définir le fichier d'extension *.xls* à analyser. Pour cela, il doit mettre en forme un fichier sous la forme suivante : La première colonne est composée de l'ensemble des ZTs de mesure. Les colonnes suivantes sont composées de l'ensemble des mesures expérimentales correspondant aux différents ZTs. Le nombre de colonnes mesures (différent de 0) correspond au nombre de réplicats de la mesure expérimentale. L'utilisateur fournit ensuite au programme le nom sans extension du fichier à analyser. L'utilisateur entre également un seuil α et un pourcentage de confiance au choix.

```

#####
##### Paramètres circadiens #####
#####
M      A24      phi24      A12      phi12
-----
2.9228  0.36008  0.5256  0.57258  4.2393

#####
##### P_values des tests 2 à 2 #####
#####
Modele_2412_versus_NULL  Modele_2412_versus_24  Modele_2412_versus_12  Modele_24_versus_NULL  Modele_12_versus_NULL
-----
6.2244e-07                2.2817e-06                0.0050443                0.016765                6.1585e-06

#####
##### Paramètres significatifs et intervalles de confiance (IC) #####
#####
Parameter      M      SE      IC_borne_inf  IC_borne_sup
-----
'M'            2.9228  0.27762  2.3786        3.4669
'A24'          0.36008  0.135    0.095492      0.62468
'Phi24'        0.5256  1.4269  -2.2711       3.3223
'A12'          0.57258  0.1346  0.30876       0.8364
'Phi12'        4.2393  0.46658  3.3248        5.1537

#####
##### DONE #####
#####

```

Figure 2 – **Premières sorties du programme : le tableau récapitulatifs des tests F et le tableau des paramètres.** Le programme renvoie en sortie la table des p-values des 4 modèles (entier, 24, 12 et NULL) testés deux à deux. Il renvoie dans un second temps la table des paramètres significatifs accompagnés de leurs intervalles de confiance.

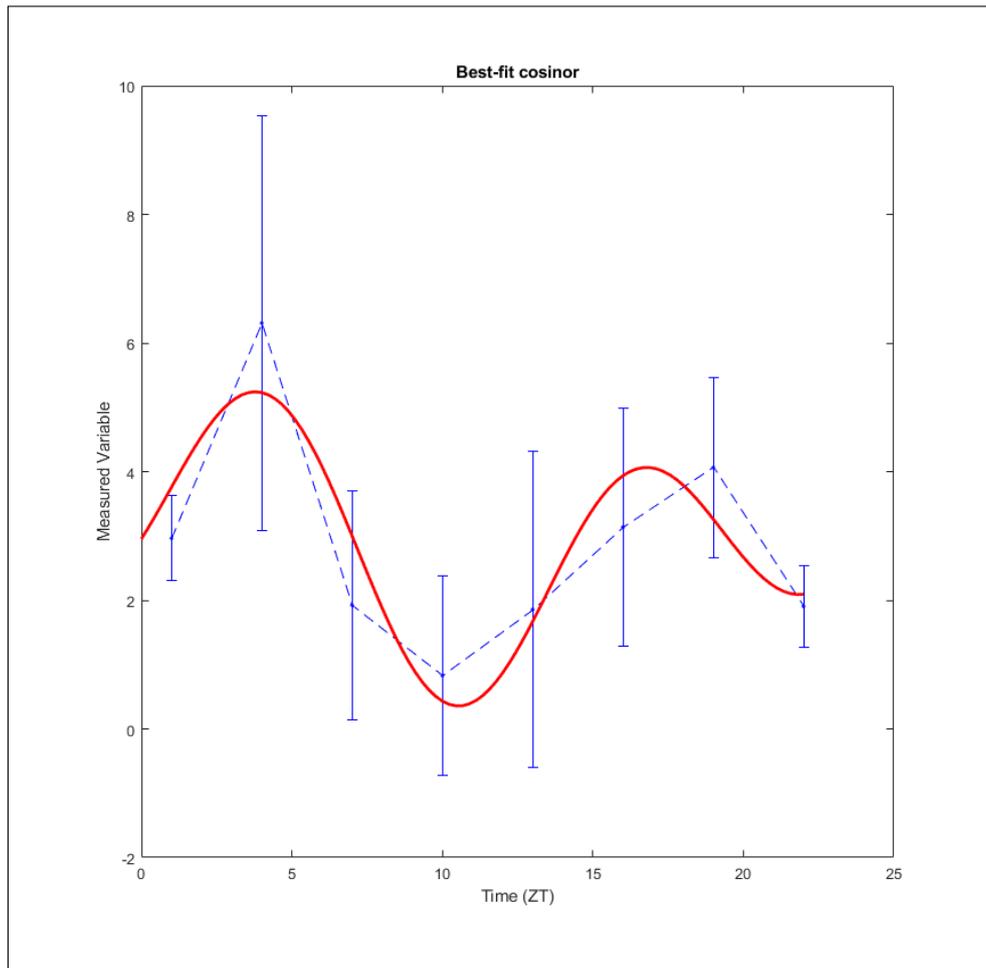


Figure 3 – Représentation graphique de l’ajustement de l’équation cosinor à deux harmoniques (rouge) aux données expérimentales (bleu). Les données utilisées sont issues des données décrites en section 3.7.3.

6.2 Le modèle PK-PD corps-entier : un système à 31 équations différentielles ordinaires mécanistes.

6.2.1 Pharmacocinétique

CPT11

$$\begin{aligned}
 \frac{d[CPT11_{sang}]}{dt} = & + \frac{V_{foie}}{V_{sang}} (AC_{foie_sang} - DC_{sang_foie}) \\
 & + \frac{V_{moelle}}{V_{sang}} (AC_{moelle_sang} - DC_{sang_moelle}) \\
 & + \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}} (AC_{tumeur_sang} - DC_{sang_tumeur}) \\
 & + \frac{V_{NET}}{V_{sang}} (AC_{NET_sang} - DC_{sang_NET}) \\
 & - \frac{V_{colon}}{V_{sang}} DC_{sang_colon} \\
 & - C_{CES_sang} \\
 & - C_{clairance_renale}
 \end{aligned} \tag{40}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[CPT11_{foie}]}{dt} = & + (DC_{sang_foie} - AC_{foie_sang}) \\
 & + DC_{colon_foie} \\
 & - \frac{V_{lumiere}}{V_{foie}} DC_{foie_lumiere} \\
 & - C_{CES_foie}
 \end{aligned} \tag{41}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[CPT11_{colon}]}{dt} = & + DC_{sang_colon} \\
 & + DC_{lumiere_colon} \\
 & - AC_{colon_lumiere} \\
 & - \frac{V_{foie}}{V_{colon}} DC_{colon_foie} \\
 & - C_{CES_colon}
 \end{aligned} \tag{42}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[CPT11_{lumiere}]}{dt} = & DC_{foie_lumiere} \\
 & + AC_{colon_lumiere} \\
 & - \frac{V_{colon}}{V_{lumiere}} DC_{lumiere_colon} \\
 & - C_{clairance_intestinale}
 \end{aligned} \tag{43}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[CPT11_{moelle}]}{dt} = & DC_{sang_moelle} \\
 & - AC_{moelle_sang} \\
 & - C_{CES_moelle}
 \end{aligned} \tag{44}$$

$$\frac{d[CPT11_{NET}]}{dt} = DC_{sang_NET} - AC_{NET_sang} \quad (45)$$

$$\frac{d[CPT11_{tumeur}]}{dt} = + DC_{sang_tumeur} - AC_{tumeur_sang} - C_{CES_tumeur} \quad (46)$$

SN38

$$\begin{aligned} \frac{d[SN38_{sang}]}{dt} = & + \frac{V_{foie}}{V_{sang}} (AS_{foie_sang} - DS_{sang_foie}) \\ & + \frac{V_{moelle}}{V_{sang}} (AS_{moelle_sang} - DS_{sang_moelle}) \\ & + \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}} (AS_{tumeur_sang} - DS_{sang_tumeur}) \\ & + \frac{V_{NET}}{V_{sang}} (AS_{NET_sang} - DS_{sang_NET}) \\ & + C_{CES_sang} \\ & - \frac{V_{colon}}{V_{sang}} DS_{sang_colon} \\ & - S_{clairance_renale} \end{aligned} \quad (47)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[SN38_{foie}]}{dt} = & + (DS_{sang_foie} - AS_{foie_sang}) \\ & + DS_{colon_foie} \\ & + S_{Decompl_foie} \\ & - C_{CES_foie} \\ & - \frac{V_{lumiere}}{V_{foie}} DS_{foie_lumiere} \\ & - S_{UGT_foie} \\ & - S_{Compl_foie} \end{aligned} \quad (48)$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38_{colon}]}{dt} = & + DS_{sang_colon} \\
& + DS_{lumiere_colon} \\
& + C_{CES_colon} \\
& + S_{Decompl_colon} \\
& - AS_{colon_lumiere} \\
& - \frac{V_{foie}}{V_{colon}} DS_{colon_foie} \\
& - S_{UGT_colon} \\
& - S_{Compl_colon}
\end{aligned} \tag{49}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38_{lumiere}]}{dt} = & + DS_{foie_lumiere} \\
& + AS_{colon_lumiere} \\
& - \frac{V_{colon}}{V_{lumiere}} DS_{lumiere_colon} \\
& - S_{clairance_intestinale}
\end{aligned} \tag{50}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38_{moelle}]}{dt} = & + DS_{sang_moelle} \\
& + C_{CES_moelle} \\
& + S_{Decompl_moelle} \\
& - AS_{moelle_sang} \\
& - S_{UGT_moelle} \\
& - S_{Compl_moelle}
\end{aligned} \tag{51}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38_{NET}]}{dt} = & + DS_{sang_NET} \\
& + S_{Decompl_NET} \\
& - AS_{NET_sang} \\
& - S_{Compl_NET}
\end{aligned} \tag{52}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38_{tumeur}]}{dt} = & + DS_{sang_tumeur} \\
& + C_{CES_tumeur} \\
& + S_{Decompl_tumeur} \\
& - AS_{tumeur_sang} \\
& - S_{UGT_tumeur} \\
& - S_{Compl_tumeur}
\end{aligned} \tag{53}$$

SN38G

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{sang}]}{dt} = & + \frac{V_{foie}}{V_{sang}} (AG_{foie_sang} - DG_{sang_foie}) \\
& + \frac{V_{moelle}}{V_{sang}} (AG_{moelle_sang} - DG_{sang_moelle}) \\
& + \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}} (AG_{tumeur_sang} - DG_{sang_tumeur}) \\
& + \frac{V_{NET}}{V_{sang}} (AG_{NET_sang} - DG_{sang_NET}) \\
& - \frac{V_{colon}}{V_{sang}} DG_{sang_colon} \\
& - G_{clairance_renale}
\end{aligned} \tag{54}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{foie}]}{dt} = & + (DG_{sang_foie} - AG_{foie_sang}) \\
& + DG_{colon_foie} \\
& + S_{UGT_foie} \\
& - \frac{V_{lumiere}}{V_{foie}} DG_{foie_lumiere}
\end{aligned} \tag{55}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{colon}]}{dt} = & + DG_{sang_colon} \\
& + DG_{lumiere_colon} \\
& + S_{UGT_colon} \\
& - AG_{colon_lumiere} \\
& - \frac{V_{foie}}{V_{colon}} DG_{colon_foie}
\end{aligned} \tag{56}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{lumiere}]}{dt} = & + DG_{foie_lumiere} \\
& + AG_{colon_lumiere} \\
& - \frac{V_{colon}}{V_{lumiere}} DG_{lumiere_colon}
\end{aligned} \tag{57}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{moelle}]}{dt} = & + DG_{sang_moelle} \\
& + S_{UGT_moelle} \\
& - AG_{moelle_sang}
\end{aligned} \tag{58}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[SN38G_{NET}]}{dt} = & + DG_{sang_NET} \\
& - AG_{NET_sang}
\end{aligned} \tag{59}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[SN38G_{tumeur}]}{dt} = & + DG_{sang_tumeur} \\ & + S_{UGT_tumeur} \\ & - AG_{tumeur_sang} \end{aligned} \quad (60)$$

6.2.2 Pharmacodynamique

Complexe réversible TOP1-ADN-SN38

$$\frac{d[Compl_{foie}]}{dt} = + S_{Compl_foie} - S_{Decompl_liver} - S_{Irr_liver} \quad (61)$$

$$\frac{d[Compl_{colon}]}{dt} = + S_{Compl_colon} - S_{Decompl_colon} - S_{Irr_colon} \quad (62)$$

$$\frac{d[Compl_{moelle}]}{dt} = + S_{Compl_moelle} - S_{Decompl_moelle} - S_{Irr_moelle} \quad (63)$$

$$\frac{d[Compl_{NET}]}{dt} = + S_{Compl_NET} - S_{Decompl_NET} - S_{Irr_NET} \quad (64)$$

$$\frac{d[Compl_{tumeur}]}{dt} = + S_{Compl_tumeur} - S_{Decompl_tumeur} - S_{Irr_tumeur} \quad (65)$$

Complexe irréversible TOP1-ADN-SN38

$$\frac{d[Compl_{foie}]}{dt} = + S_{Irr_liver} \quad (66)$$

$$\frac{d[Compl_{colon}]}{dt} = + S_{Irr_colon} \quad (67)$$

$$\frac{d[Compl_{moelle}]}{dt} = + S_{Irr_moelle} \quad (68)$$

$$\frac{d[Compl_{NET}]}{dt} = + S_{Irr_NET} \quad (69)$$

$$\frac{d[Compl_{tumeur}]}{dt} = + S_{Irr_tumeur} \quad (70)$$

6.3 Les paramètres fixés du modèle PK-PD corps-entier chez les souris B6D2F1.

Pharmacodynamique (μM) [13]

$$k_{form_organe} = 2432.42$$

$$k_{form2_organe} = 0.0035$$

$$k_{diss_organe} = 2.56$$

$$[DNA_{total}] = 62.5$$

Efflux ($\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$) [13]

$$k_{eff_CPT} = 57.72$$

$$k_{eff_SN} = 1.28$$

$$k_{eff_SNG} = 1.28$$

Biotransformation (μM) [13]

$$k_{CES_organe} = 147.34$$

$$k_{UGT_organe} = 2.69$$

Volumes ♂ (L)

$$V_{sang} = 0.00155 [24]$$

$$V_{moelle_osseuse} = 0.00105 [29]$$

$$V_{colon} = 0.000285 \times 0.1 [30] [31]$$

$$V_{lumiere} = 0.000285 \times 0.9 [30] [16]$$

$$V_{foie} = 0.00123 [32] [31]$$

$$V_{tumeur} = 0.001 [15]$$

$$V_{NET} = 0.016 [16]$$

Volumes ♀ (L)

$$V_{sang} = 0.00110 [24]$$

$$V_{moelle_osseuse} = 0.00105 [29]$$

$$V_{colon} = 0.000226 \times 0.1 [30] [31]$$

$$V_{lumiere} = 0.000226 \times 0.9 [30] [16]$$

$$V_{foie} = 0.000866 [32] [31]$$

$$V_{tumeur} = 0.001 [15]$$

$$V_{NET} = 0.016 [16]$$

Paramètres circadiens

Les valeurs des paramètres circadiens des protéines CES1, UGT1A, TOP1 et ABCB1 dans le colon et le foie, et la protéine CYCA dans le colon, sont disponibles dans la **table 1**.

6.4 Les valeurs estimées des paramètres du modèle PK-PD corps-entier chez les souris B6D2F1 femelles.

Les paramètres ont été estimés par la méthode des moindres carrés améliorés et en utilisant l'algorithme CMAES pour la tâche de minimisation (section 3.6).

Constantes de diffusion (h^{-1})

$$\begin{aligned}
 k_{absCPT_moelle} &= 0.0078, k_{absSN_moelle} = 0.0036, k_{absSNG_moelle} = 0.49 \\
 k_{absCPT_colon} &= 0.15, k_{absSN_colon} = 0.25, k_{absSNG_colon} = 0.012 \\
 k_{absCPT_foie} &= 0.18, k_{absSN_foie} = 0.17, k_{absSNG_foie} = 0.21 \\
 k_{absCPT_tumeur} &= 0.020, k_{absSN_tumeur} = 0.0059, k_{absSNG_tumeur} = 0.33 \\
 k_{absCPT_NET} &= 0.58, k_{absSN_NET} = 0.10, k_{absSNG_NET} = 0.30 \\
 k_{absCPT_lumiere} &= 0.90, k_{absSN_lumiere} = 300, k_{absSNG_lumiere} = 0.19 \\
 k_{absCPT_colon_foie} &= 0.05, k_{absSN_colon_foie} = 85, k_{absSNG_colon_foie} = 0.14 \\
 k_{absCPT_lumiere_colon} &= 0.7, k_{absCPT_lumiere_colon} = 50, k_{absCPT_lumiere_colon} = 0.5
 \end{aligned}$$

Vitesses maximales de réaction ($microM.h^{-1}$)

$$\begin{aligned}
 V_{effCPT}[ABCB1_{moelle_sang}] &= 25, V_{effSN}[ABCG2_{moelle_sang}] = 138071 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{foie_sang}] &= 26, V_{effSN}[ABCG2_{foie_sang}] = 10000 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{NET_sang}] &= 80, V_{effSN}[ABCG2_{NET_sang}] = 23557 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{tumeur_sang}] &= 16, V_{effSN}[ABCG2_{tumeur_sang}] = 43362 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{colon_lumiere}] &= 33, V_{effSN}[ABCG2_{colon_lumiere}] = 19999 \\
 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{moelle_sang}] &= 777 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{foie_sang}] &= 569 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{NET_sang}] &= 11 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{tumeur_sang}] &= 42 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{colon_lumiere}] &= 999 \\
 \\
 V_{CES_sang} &= 6.9, V_{CES_moelle} = 1.4, V_{CES_colon} = 0.00027 \\
 V_{CES_foie} &= 6.9, V_{CES_tumeur} = 2.1 \\
 \\
 V_{UGT_moelle} &= 24188, V_{UGT_colon} = 6.7, V_{UGT_foie} = 92737 \\
 V_{UGT_tumeur} &= 147
 \end{aligned}$$

Paramètres de clairance (h^{-1})

$$\begin{aligned}
 k_{ren_CPT} &= 6.4, k_{ren_SN} = 0.20, k_{ren_SNG} = 3.7 \\
 k_{int_CPT} &= 0.15, k_{ren_SN} = 20
 \end{aligned}$$

Paramètres circadiens du modèle PK-PD calibré chez les souris B6D2F1 mâles

| Protéine | A24 | ϕ_{24} (h) |
|----------|-------|-----------------|
| ABCB1 | 0.35 | 21.5 |
| ABCG2 | 0.01 | 15.3 |
| CES | 0.039 | 18.1 |
| UGT | 0.26 | 10.1 |
| TOP1 | 0.45 | 7.2 |
| CYCA | 0.36 | 8.9 |

Table 2 – Moelle osseuse.

| Protéine | A24 | ϕ_{24} (h) |
|----------|------|-----------------|
| ABCB1 | 0.35 | 21.5 |
| ABCG2 | 0.26 | 7.1 |
| CES | 0.5 | 7.6 |
| UGT | 0.05 | 24.7 |
| TOP1 | 0.04 | 12.6 |
| CYCA | 0.05 | 20.5 |

Table 3 – Tumeur xéno greffée.

| Protéine | A24 | ϕ_{24} (h) |
|----------|------|-----------------|
| ABCB1 | 0.37 | 1.8 |
| ABCG2 | 0.48 | 0 |

Table 4 – NET.

| Protéine | A24 | ϕ_{24} (h) |
|----------|------|-----------------|
| ABCG2 | 0.29 | 14.6 |
| CYCA | 0.4 | 4.2 |

Table 5 – Foie.

| Protéine | A24 | ϕ_{24} (h) |
|----------|------|-----------------|
| ABCG2 | 0.29 | 14.6 |
| CYCA | 0.4 | 4.2 |

Table 6 – Foie.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCG2 | 0.5 | 26 |

Table 7 – Colon.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| CES | 0.00024 | 12.8 |

Table 8 – Sang.

| Clairance | A24 | ϕ24 (h) |
|------------------|------------|--------------------------------|
| Rénale | 0.21 | 18.7 |
| Intestinale | 0.29 | 20.1 |

Table 9 – Clairance rénale et intestinale.

6.5 Estimation des paramètres du modèle PK-PD pour les souris B6D2F1 femelles

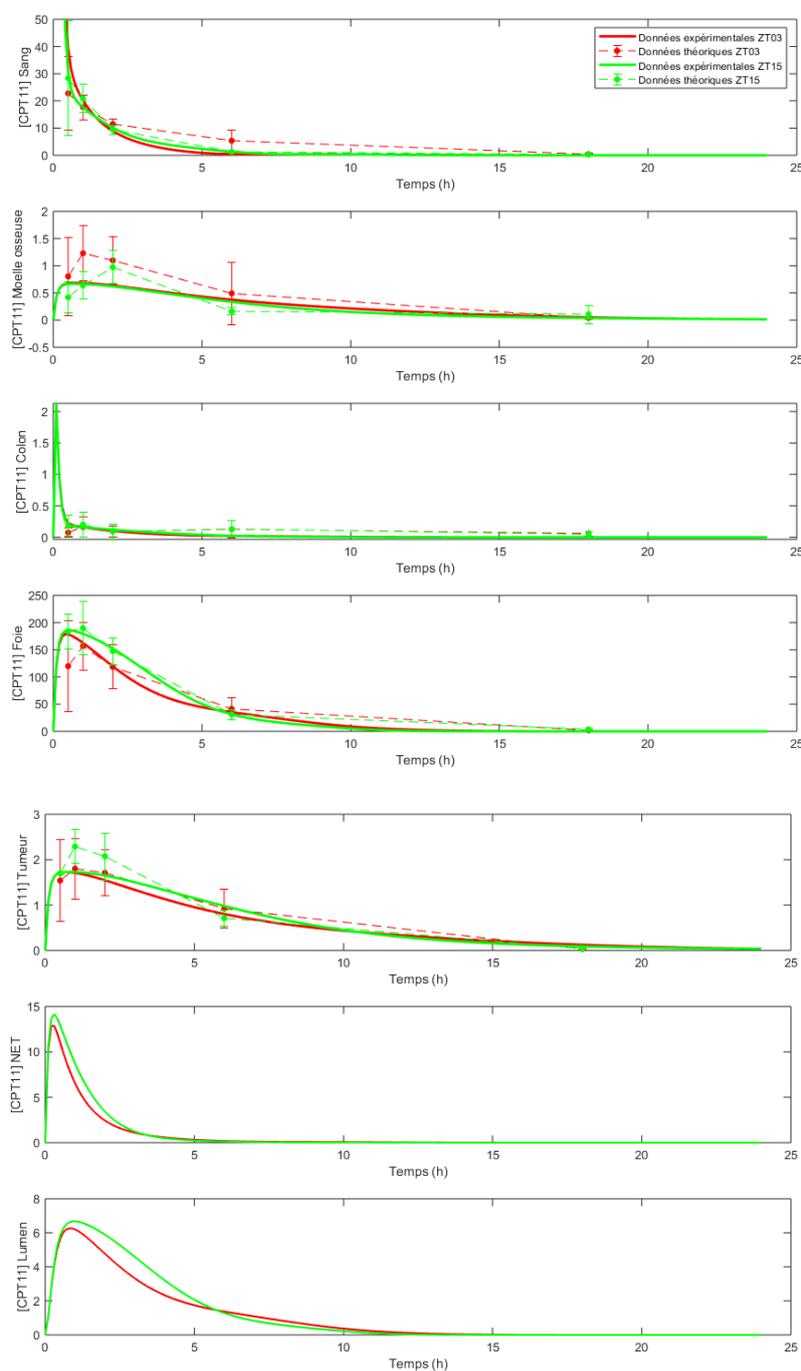


Figure 4 – Estimation numérique de la pharmacocinétique du CPT11 chez les souris B6D2F1 *femelles* après injection du CPT11 à ZT3 (rouge) et ZT15 (vert), à partir du modèle PK-PD corps-entier. Chaque point correspond à la concentration moyenne du CPT11 en μM (+SEM avec $n = 5$). Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement du modèle PK-PD aux données expérimentales PK femelles (décrites en section 3.7.2).

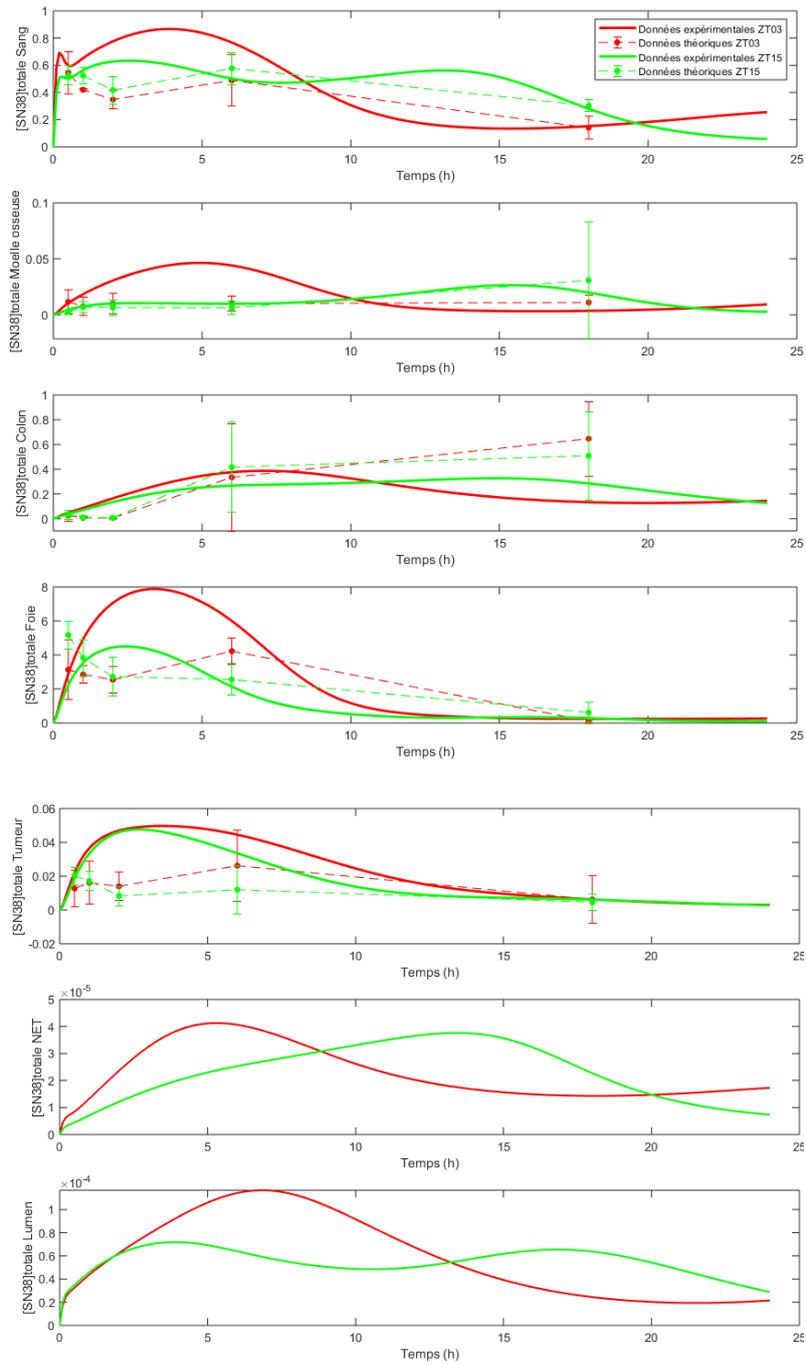


Figure 5 – Estimation numérique de la pharmacocinétique du SN38 chez les souris B6D2F1 mâles après injection du CPT11 à ZT3 (rouge) et Z15 (vert), à partir du modèle PK-PD corps-entier. Chaque point correspond à la concentration moyenne du SN38 en μM (+SEM avec $n = 5$). Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement du modèle PK-PD aux données expérimentales PK femelles (décrites en section 3.7.2).

**Paramètres PK du modèle PK-PD calibré chez les souris B6D2F1
femelles**

Constantes de diffusion (h^{-1})

$$\begin{aligned}
 k_{absCPT_moelle} &= 0.0052, k_{absSN_moelle} = 0.053, k_{absSNG_moelle} = 0.14 \\
 k_{absCPT_colon} &= 0.12, k_{absSN_colon} = 0.15, k_{absSNG_colon} = 0.20 \\
 k_{absCPT_foie} &= 1.5, k_{absSN_foie} = 0.55, k_{absSNG_foie} = 1.4 \\
 k_{absCPT_tumeur} &= 0.013, k_{absSN_tumeur} = 0.00093, k_{absSNG_tumeur} = 0.0047 \\
 k_{absCPT_NET} &= 0.14, k_{absSN_NET} = 0.89, k_{absSNG_NET} = 0.30 \\
 k_{absCPT_lumiere} &= 0.17, k_{absSN_lumiere} = 8.3, k_{absSNG_lumiere} = 0.19 \\
 k_{absCPT_colon_foie} &= 0.89, k_{absSN_colon_foie} = 337, k_{absSNG_colon_foie} = 0.21 \\
 k_{absCPT_lumiere_colon} &= 0.49, k_{absCPT_lumiere_colon} = 91, k_{absCPT_lumiere_colon} = 0.071
 \end{aligned}$$

Vitesses maximales de réaction ($microM.h^{-1}$)

$$\begin{aligned}
 V_{effCPT}[ABCB1_{moelle_sang}] &= 9.7, V_{effSN}[ABCG2_{moelle_sang}] = 142393 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{foie_sang}] &= 32, V_{effSN}[ABCG2_{foie_sang}] = 150000 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{NET_sang}] &= 85, V_{effSN}[ABCG2_{NET_sang}] = 17457 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{tumeur_sang}] &= 4.9, V_{effSN}[ABCG2_{tumeur_sang}] = 199459 \\
 V_{effCPT}[ABCB1_{colon_lumiere}] &= 17, V_{effSN}[ABCG2_{colon_lumiere}] = 5004 \\
 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{moelle_sang}] &= 245 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{foie_sang}] &= 2614 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{NET_sang}] &= 132 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{tumeur_sang}] &= 390 \\
 V_{effSNG}[ABCG2_{colon_lumiere}] &= 9347 \\
 \\
 V_{CES_sang} &= 8.2, V_{CES_moelle} = 1.7, V_{CES_colon} = 3.1 \\
 V_{CES_foie} &= 26, V_{CES_tumeur} = 14 \\
 V_{UGT_moelle} &= 15951, V_{UGT_colon} = 84, V_{UGT_foie} = 48645 \\
 V_{UGT_tumeur} &= 1
 \end{aligned}$$

Paramètres de clairance (h^{-1})

$$\begin{aligned}
 k_{ren_CPT} &= 6.5, k_{ren_SN} = 4.5, k_{ren_SNG} = 13 \\
 k_{int_CPT} &= 4.8, k_{ren_SN} = 22
 \end{aligned}$$

**Paramètres circadiens du modèle PK-PD calibré chez les souris B6D2F1
femelles**

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCB1 | 0.17 | 22.3 |
| ABCG2 | 0.33 | 19.7 |
| CES | 0.48 | 23.6 |
| UGT | 0.25 | 16.7 |
| TOP1 | 0.33 | 5.7 |
| CYCA | 0.44 | 1.3 |

Table 10 – Moelle osseuse.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCB1 | 0.17 | 18.1 |
| ABCG2 | 0.19 | 22.2 |
| CES | 0.44 | 3.3 |
| UGT | 0.32 | 19.3 |
| TOP1 | 0.49 | 14.6 |
| CYCA | 0.3 | 10.2 |

Table 11 – Tumeur xéno greffée.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCB1 | 0.4 | 22.9 |
| ABCG2 | 0.32 | 3.7 |

Table 12 – NET.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCG2 | 0.39 | 19.8 |
| CYCA | 0.17 | 7.5 |

Table 13 – Foie.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCG2 | 0.29 | 14.6 |
| CYCA | 0.4 | 4.2 |

Table 14 – Foie.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| ABCG2 | 0.28 | 13.9 |

Table 15 – Colon.

| Protéine | A24 | ϕ24 (h) |
|-----------------|------------|--------------------------------|
| CES | 0.34 | 25 |

Table 16 – Sang.

| Clairance | A24 | ϕ24 (h) |
|------------------|------------|--------------------------------|
| Rénale | 0.39 | 20.2 |
| Intestinale | 0.47 | 17.5 |

Table 17 – Clairance rénale et intestinale.

6.6 Chronotoxicités théoriques dans le colon et la moelle osseuse de souris B6D2F1 femelles

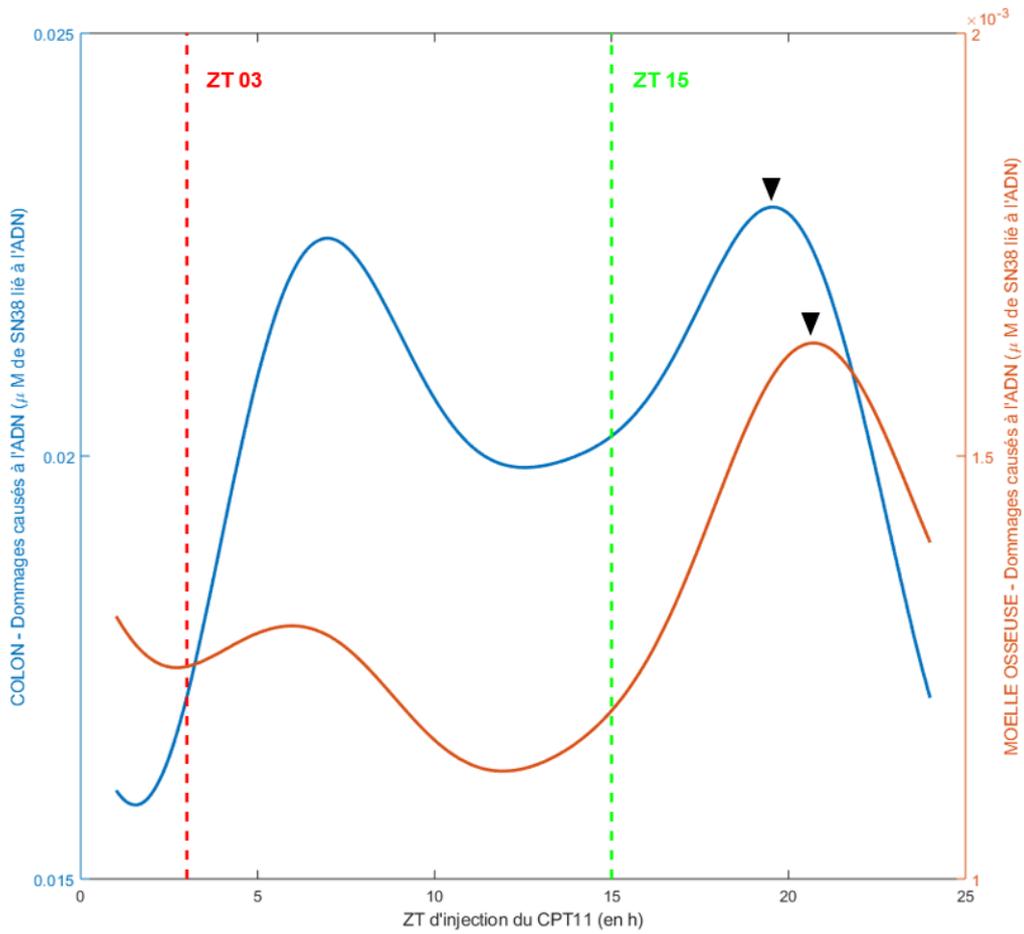


Figure 6 – **Simulation de la chronotoxicité intestinales (bleu) et hématologique (orange) à partir du modèle PK-PD femelle.** Les abscisses représentent 240 ZT d'injection variant de ZT0 à ZT24. L'axe des ordonnées représente la valeur de la somme des variables $Compl + Icompl$ du modèle PK-PD, 24h après injection. Les ZT d'injection ZT15 (vert) et ZT3 (rouge) correspondent respectivement à l'heure de meilleure et pire tolérabilité de l'irinotecan déterminées *experimentalement* chez les souris B6D2F1 femelles d'après [11]. Les flèches noires indiquent les pics de toxicité de l'irinotecan calculés numériquement.