

## Abréviations

- 5-FU : 5-Fluorouracil
- ABC transporter : ATP-Binding Cassette transporter
- ANOVA : ANalysis Of VAriance
- BMAL : Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Like
- CES : Carboxylesterases
- CPT11 : irinotecan
- CRY : Cryptochrome
- CT : Circadian Time
- CycA : Cycline A
- CYP : Cytochrome
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- FBS : Foetal Bovine Serum
- FDA : Food and Drug Administration
- GOS : Glasgow OSteosarcoma
- GSH : Glutathione
- HALO : Hour After Light Onset
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- LD : Light-Dark
- LLOQ : Lower Limit Of Quantification
- MME : Membrane Mitochondriale Externe
- NET : Non Eliminating Tissue
- NPAS : Neuronal PAS domain-containing protein
- NSC : Noyaux SupraChiasmatiques
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PER : PERiod
- PD : PharmacoDynamics
- PK : PharmacoKinetics
- PVDF : Polyvinylidene Fluoride
- RE : Reticulum Endoplasmique
- RT-qPCR : Reverse Transcriptase- quantitative Polymerase Chain Reaction
- SN38 : 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
- STREP : Specific Targeted REsearch Project
- TOP1 : Topoisomerase 1
- TS : Thymidylate Synthetase
- UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransferase 1A1
- ZT : Zeitgeber Time



# Table des matières

<b>1</b>	<b>La Chronothérapie des cancers</b>	<b>29</b>
1.1	Les Rythmes Circadiens . . . . .	29
1.1.1	Le pacemaker circadien : les noyaux suprachiasmatiques	29
1.1.2	L'oscillateur circadien moléculaire . . . . .	29
1.1.3	Persistance des rythmes circadiens <i>in vitro</i> . . . . .	32
1.2	Chronotoxicité et chronoefficacité des médicaments anticancéreux . . . . .	32
1.2.1	Dans les modèles pré-cliniques . . . . .	32
1.2.2	En clinique . . . . .	36
1.2.3	Modélisation mathématique pour la personnalisation des traitements chronomodulés . . . . .	39
1.3	Le médicament anticancéreux Irinotecan . . . . .	40
1.3.1	Découverte et usage clinique de l'Irinotecan . . . . .	40
1.3.2	La pharmacocinétique-pharmacodynamie moléculaire de l'irinotecan . . . . .	41
1.3.3	Chronotoxicité et chronoefficacité de l'irinotecan . . . . .	44
1.3.4	Résistance acquise à l'Irinotecan . . . . .	45
<b>2</b>	<b>Optimisation de l'exposition circadienne de cultures de cellules Caco-2 à l'irinotecan</b>	<b>49</b>
2.1	Motivations . . . . .	49
2.1.1	Preuve de concept <i>in vitro</i> . . . . .	49
2.1.2	Mise en oeuvre de l'approche combinée . . . . .	49
2.2	Le modèle mathématique de la PK-PD moléculaire du CPT11	50
2.2.1	Modélisation de la pharmacocinétique . . . . .	51
2.2.2	Modélisation de la pharmacodynamie . . . . .	53
2.2.3	Modélisation de la rythmicité circadienne des protéines	54
2.2.4	États d'équilibre . . . . .	56
2.3	Étude expérimentale de la PK-PD de l'irinotecan sur des cellules Caco-2 . . . . .	57
2.3.1	PK-PD du CPT11 dans des cellules non-synchronisées	57
2.3.2	Contrôle circadien de la PK-PD du CPT11 dans des cellules synchronisées . . . . .	60

2.4	Estimation des paramètres du modèle mathématique, par comparaison aux données expérimentales . . . . .	67
2.5	Optimisation théorique de l'exposition circadienne des Caco-2 au CPT11 . . . . .	74
2.6	Discussion et perspectives . . . . .	79
2.7	Etude de la résistance acquise au CPT11 . . . . .	82
2.7.1	Motivations . . . . .	82
2.7.2	Ajout d'un modèle d'induction des transporteurs ABC par le CPT11 . . . . .	83
2.7.3	Stratégies thérapeutiques théoriquement optimales en cas de multirésistance . . . . .	85
2.7.4	Discussion . . . . .	90
2.7.5	Conclusion . . . . .	90
2.7.6	Résultats expérimentaux sur culture de cellules Caco-2 . . . . .	91
2.8	Etude de l'équilibre des formes lactone et carboxylate du CPT11 . . . . .	93
<b>3</b>	<b>Vers l'optimisation de l'administration chronomodulée du CPT11 chez la souris</b>	<b>97</b>
3.1	Motivations . . . . .	97
3.2	Le modèle mathématique "corps entier" à base physiologique de la PK-PD du CPT11 . . . . .	98
3.2.1	Modélisation de la PK "corps entier" du CPT11 . . . . .	99
3.2.2	Modélisation de la PD "corps entier" du CPT11 . . . . .	106
3.2.3	Modélisation des concentrations de protéines de la pharmacologie du CPT11 . . . . .	107
3.2.4	État initial . . . . .	107
3.3	Estimation des paramètres pour la classe 2 . . . . .	107
3.4	Discussion et perspectives . . . . .	116
<b>4</b>	<b>Étude du contrôle de l'oncogène SRC sur la voie mitochondriale de l'apoptose</b>	<b>119</b>
4.1	Motivations . . . . .	119
4.2	L'oncogène SRC et la voie mitochondriale de l'apoptose . . . . .	120
4.2.1	La tyrosine kinase SRC . . . . .	120
4.2.2	La voie mitochondriale de l'apoptose et les protéines de la famille BCL2 . . . . .	120
4.3	Etude expérimentale et mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés . . . . .	121
4.3.1	Méthodes expérimentales . . . . .	122
4.3.2	Protéines de la famille BCL2 présentes dans les fibroblastes NIH-3T3 transformés ou non. . . . .	122
4.3.3	Cinétique de BIK en conditions non-apoptotiques . . . . .	122
4.3.4	Comportement de BIK suite à un stress apoptotique . . . . .	125



4.3.5	Modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose . . . . .	126
4.3.6	Stratégies thérapeutiques optimales . . . . .	133
4.4	Discussion et conclusion . . . . .	139
<b>5</b>	<b>Les Outils Mathématiques</b>	<b>141</b>
5.1	Modélisation de réactions biochimiques . . . . .	141
5.1.1	Loi d'action de masse . . . . .	141
5.1.2	La loi cinétique de Michaelis-Menten . . . . .	142
5.1.3	Modéliser la diffusion passive à travers une membrane	143
5.2	La formule du cosinor . . . . .	144
5.3	Estimation de paramètres . . . . .	145
5.3.1	La méthode des moindres carrés . . . . .	145
5.3.2	Améliorer la méthode des moindres carrés par la technique du bootstrap. . . . .	145
5.4	Procédures d'optimisation sous contrôle . . . . .	146
5.5	Les algorithmes de minimisation . . . . .	147
<b>6</b>	<b>Matériel et Méthodes expérimentales</b>	<b>149</b>
6.1	Étude de la PK-PD du CPT11 sur cellules Caco-2 . . . . .	149
6.1.1	Médicaments . . . . .	149
6.1.2	Culture de cellules Caco-2 . . . . .	149
6.1.3	Quantification des ARN par RT-qPCR . . . . .	150
6.1.4	Chromatographie à phase liquide haute performance .	150
6.1.5	Dosage de l'activité Topoisomérase 1 . . . . .	152
6.1.6	Mesure d'apoptose par viabilité cellulaire et caspases .	153
6.2	Étude de l'apoptose par voie mitochondriale dans les cellules NIH-3T3 . . . . .	153
6.2.1	Microscopie confocale . . . . .	153
<b>7</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>155</b>
<b>A</b>	<b>Theoretical Optimization of Irinotecan-based Anticancer Strategies in case the of Drug-induced Efflux, <i>Applied Mathematics Letters</i>, sous presse.</b>	<b>159</b>
<b>B</b>	<b>A Combined Experimental and Mathematical Approach for Molecular-based Optimization of Irinotecan Circadian Delivery, <i>PloS Computational Biology</i>, en cours de révision</b>	<b>169</b>
<b>C</b>	<b>Court-métrage de vulgarisation scientifique : "Soyez Sympa, Synchronisez !"</b>	<b>213</b>



# Avant propos

Les projets de recherche présentés dans cette thèse sont le fruit de collaborations entre l'Institut National de Recherche en Informatique et Automatique (INRIA), et plusieurs équipes de recherche en biologie, aussi bien françaises qu'internationales. Ils ont été financés par l'union européenne à travers les projets STREP (Specific targeted research project) TEMPO (LSHC-CT-2006-037543) et ErasysBio+ Circadian and Cell Cycle Clocks in Cancer (C5Sys, ANR-09-SYSB-007-04), et le réseau d'excellence BioSim (LSHB-CT-2004-005137).

L'étude de la chronopharmacologie de l'irinotecan (chapitre 1-3) a été réalisée au sein d'une collaboration entre l'équipe-projet BANG de l'INRIA de Rocquencourt (Yvelines, France) et l'équipe INSERM U776 "Rythmes biologiques et cancer" à Villejuif (Val-de-Marne, France). Les travaux de modélisation mathématique ont été réalisés par moi-même et encadrés par Jean Clairambault, du projet BANG et de l'équipe U776. L'expérimentation *in vitro* sur cultures de cellules, présentée au chapitre 2, a été réalisée par Sandrine Dulong (post-doctorante, laboratoire U776) et moi-même, aidées des stagiaires Lisa Henning et Fabien Chevalier. La méthode de chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) a été élaborée et réalisée dans un premier temps par Alper Okyar (équipe U776 et l'université d'Istanbul, Turquie), puis par Chadi Abbara, affilié à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, et Boris Cohen, stagiaire au sein de l'unité U776. L'ensemble des travaux biologiques a été encadré par Francis Lévi, directeur de l'unité U776.

Les résultats expérimentaux *in vivo* chez la souris, qui sont utilisés au chapitre 3, ont été réalisés par Constance Ahowesso, Xiao-Mei Li, Virginie Hossard, Sandrine Dulong, Elisabeth Filipinski, et Alper Okyar du laboratoire U776, sous l'encadrement de Francis Lévi. La quantification de protéines a été effectuée par Enza Piccolo, sous la direction de Stefano Iacobelli de CINBO (Chieti, Italie). Les dosages de pharmacocinétique sanguine et tissulaire ont été réalisés par l'équipe de Francesco Scalione (Université de Milan, Italie).

L'étude de l'oncogène SRC présentée au chapitre 4 a été menée en collaboration avec l'équipe INSERM 1052 du centre de recherche en cancérologie de Lyon, à l'Université de Lyon, plus particulièrement avec Jonathan Lopez (post-doctorant), Philippe Gonzalo (maître de conférence, praticien hospitalier) et Germain Gillet (directeur du laboratoire). Marie Doumic-Jauffret du projet BANG de l'INRIA et moi-même avons réalisé la modélisation mathématique.

Enfin, les méthodes d'estimation de paramètres ont été conçues en bénéficiant des conseils avisés d'Ali Mohammad Djafari du laboratoire des signaux et systèmes (L2S, Gif-sur-Yvette, France), et de Sylvain Soliman et François Fages du projet CONTRAINTES de l'INRIA de Rocquencourt.

## Articles dans des revues internationales

- **Theoretical Optimization of Irinotecan-based Anticancer Strategies in case the of Drug-induced Efflux**, Applied Mathematics Letters, *sous presse* (cf. annexe A). La traduction française de cet article est présentée à la section 2.7.
- **A Combined Experimental and Mathematical Approach for Molecular-based Optimization of Irinotecan Circadian Delivery**, PloS Computational Biology, *en cours de révision* (cf. annexe B). Cet article correspond aux sections 2.1 à 2.6.
- **Modeling SRC Control on the Mitochondrial Pathway of Apoptosis : Implication for Therapeutics Optimization**, PLoS Computational Biology, *en préparation*. Ces travaux sont exposés au chapitre 4.

## Communications à des conférences

### Conférencière invitée

- Avril 2011 : "Mathematics and Biology : Young investigators International Workshop", Rouen, France
- Décembre 2009 : séminaire "Modélisation mathématique pour la biologie et la santé", Institut Camille Jordan, Université Lyon I, France

### Communications orales

- Novembre 2010 : "Cancer Pharmacogenetics : Personalizing Medicine", Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Espagne
- Juin 2010 : deuxième congrès international de la Société Marocaine de Mathématiques appliquées (SM2A), Rabat, Maroc

- Mai 2010 : troisième conférence internationale de la Société Francophone de Biologie Théorique (SFBT), Tunis, Tunisie
- Février 2010 : "Rôle et Impact des Mathématiques en Médecine", Paris, France
- Janvier 2010 : "Mathematical Model in Systems Biology", Tel Aviv, Israel
- Novembre 2009 : clôture du projet européen TEMPO, Paris, France
- Juin 2009 : XXIXe Séminaire de la SFBT : "démarches quantitatives, qualitatives et philosophiques en sciences du vivant", Saint-Flour, France
- Avril 2009 : "Spring Workshop on Mathematical Modelling in Biology and Medicine", Dubrovnik, Croatie
- Mars 2009 : séminaire de la Société Francophone de Chronobiologie, Aussois, France
- Décembre 2008 : atelier sur la PK-PD des anticancéreux : résistances et synergies, Paris, France
- Juin 2008 : présentation dans le cadre du projet européen TEMPO, Milan, Italie
- Juin 2008 : première rencontre CRM-INRIA-MITACS, Université de Montréal, Canada
- Juin 2008 : "Graduate Summer School in Mathematical Biology", Vancouver, Canada
- Mars 2008 : présentation dans le cadre du projet européen TEMPO, Oxford, Angleterre
- Août 2007 : "Modelling, Mathematical Methods and Computer Simulation of Tumour Growth and Therapy", Dundee, Ecosse

## Posters

- Octobre 2010 : "Functional Genomics towards Personalized Health Care", Santorin, Grèce
- Octobre 2009 : journées IAL jeunes chercheurs, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France
- Octobre 2009 : premier colloque de l'Institut des Technologies de la Santé (ITMO ITS), Paris, France
- Octobre 2008 : "Systems Biology for Medical Applications Summer School", Tenerife, Espagne

## Participation en tant qu'auditrice

- Juin 2009 : "Cancer Systems Biology summer school", Rostock, Allemagne.
- Février 2009 : "Recent developments in medical mathematics in cancerology : modelling and mathematical analysis", Marseille, France
- Janvier 2008 : "Marrakesh International Conference and Workshop on

Mathematical Biology", Marrakech, Maroc.

## Prix

- **Prix Delattre** de la meilleure présentation d'un doctorant décerné par la Société Francophone de Biologie Théorique (SFBT), mai 2009.

## Travaux de vulgarisation scientifique

- Écriture, réalisation et montage d'un **court-métrage de vulgarisation scientifique** : "**Soyez Sympa, Synchronisez !**", dans le cadre du festival "Les Chercheurs Font leur Cinéma", organisé par l'association des doctorants de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). Le festival a obtenu le prix "Le Goût des Sciences" du Ministère de la Recherche et de l'Innovation, novembre 2009 (cf. annexe C) : <http://annabelle.ballesta.fr>
- Entrevue pour le site internet de vulgarisation scientifique **Interstices**, juillet 2010 : [http://interstices.info/jcms/n\\_52317/annabelle-ballesta-a-la-decouverte-des-biomathematiques](http://interstices.info/jcms/n_52317/annabelle-ballesta-a-la-decouverte-des-biomathematiques)
- Entrevue filmée pour le site internet du magazine **Phosphore**, à l'occasion d'un test adressé aux lycéens "Avez-vous le profil pour devenir chercheur dans le numérique?", octobre 2008 : <http://www.phosphore.com/orientation/tests-ame/avez-vous-le-profil-pour-devenir-chercheur-dans-le-numerique.html>







# Chapitre 1

## La Chronothérapie des cancers

### 1.1 Les Rythmes Circadiens

Les rythmes biologiques d'une période comprise entre 20 et 28 h sont appelés rythmes circadiens, du latin *circa diem*, environ un jour. La plupart des fonctions physiologiques chez les mammifères présentent une rythmicité circadienne. C'est par exemple le cas de l'alternance activité-repos, de la température corporelle, du rythme cardiaque, de la pression sanguine, de la sécrétion d'enzymes digestives dans le tube gastro-intestinal, de la production d'hormones et de protéines du métabolisme ([1]). Cette régulation circadienne permet une anticipation des besoins énergétiques au cours de la période de 24 h. Elle contribue ainsi à la gestion optimale de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme.

#### 1.1.1 Le pacemaker circadien : les noyaux suprachiasmatiques

Le système circadien est contrôlé chez les mammifères par un pacemaker central situé au niveau de l'hypothalamus dans le cerveau : les noyaux suprachiasmatiques (NSC). Les NSC présentent des rythmes endogènes, d'une période définie par le profil génétique de l'individu, comprise entre 23 et 25 h ([2]). L'endogénéité de ces rythmes est démontrée par leur persistance lorsque l'individu est soumis à une constante obscurité. Les NSC sont entraînés par des facteurs environnementaux tels que la lumière, l'activité socio-professionnelle et la prise de nourriture qui recalibrent chaque jour leur période à 24 h ([1]).

#### 1.1.2 L'oscillateur circadien moléculaire

Le pacemaker central que constituent les NSC exerce un contrôle sous la forme de différents signaux physiologiques sur les horloges périphériques

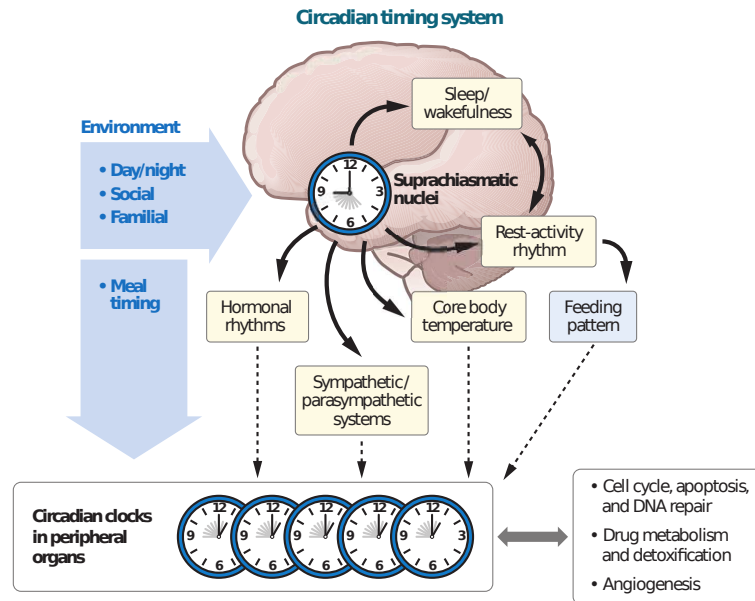


FIG. 1.1: **Représentation schématique du système circadien** Le système circadien est composé de a) un pacemaker central, les noyaux suprachiasmatiques (NSC) situés dans l'hypothalamus, b) des signaux circadiens générés par les NSC et c) des horloges circadiennes des cellules dans les tissus périphériques. Les NSC exercent un contrôle sur les horloges périphériques à travers des signaux hormonaux, le système nerveux sympathique et para-sympathique, ou des cycles de température. Les horloges moléculaires contrôlent rythmiquement le métabolisme des médicaments ainsi que le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et l'angiogénèse. Figure adaptée de [1]

(Figure 1.1). En effet, chaque cellule nucléée des organes périphériques est dotée d'une horloge circadienne moléculaire constituée de gènes de l'horloge interconnectés par des boucles de régulation. Ce réseau génique génère, de par sa structure, des oscillations dans la quantité d'ARN messagers et de protéines des gènes de l'horloge. Ces rythmes induisent ensuite des variations dans l'expression d'autres gènes, en particulier ceux impliqués dans le métabolisme des médicaments, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et l'angiogénèse ([3]).

Les oscillations circadiennes sont générées par des boucles de rétroaction soit transcriptionnelles soit post-transcriptionnelles. Les gènes de l'horloge peuvent être classés en deux catégories. La catégorie positive se compose des facteurs de transcription BMAL1, CLOCK, et NPAS2, la catégorie négative des gènes cryptochrome (Cry) et période (Per). Les hétérodimères BMAL1-CLOCK ou BMAL1-NPAS2 activent la transcription de Cry et Per. Les protéines CRY et PER s'accumulent alors dans le cytoplasme et forment

des complexes hétérotypiques qui inhibent l'action des complexes BMAL1-CLOCK/NPAS2 et répriment ainsi leur propre expression. Cela conduit à une diminution de la quantité de protéines CRY et PER en-dessous de la concentration seuil nécessaire à l'autorépression, ce qui déclenche un nouveau cycle de transcription de *Cry* et *Per* (Figure 1.2).

En parallèle, les régulateurs transcriptionnels positifs (BMAL1, CLOCK, NPAS2) et négatifs (CRY, PER) respectivement activent et répriment la transcription du récepteur nucléaire orphelin Rev-Erb $\alpha$ , et probablement celle de Rev-Erb $\beta$ . Les protéines REV-ERB $\alpha$  /  $\beta$  répriment ensuite fortement la transcription de *Bmal1* et plus modérément celle de *Clock* ([4]). Ce couplage n'est pas nécessaire pour la génération de rythmes mais contribue à la robustesse de l'horloge moléculaire. Les protéines NONO et les kinases CK1 $\epsilon$ / $\delta$  jouent le rôle d'inhibiteur de CRY1/2 tandis que WDR5 inhibe les protéines PER, ce qui contribue également à la robustesse de l'oscillateur (Figure 1.2, [3]).

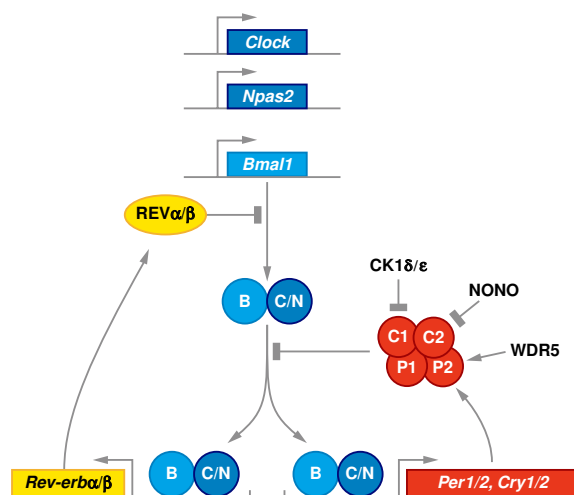


FIG. 1.2: **Modèle simplifié de l'oscillateur circadien chez les mammifères**  
L'oscillateur moléculaire est composé d'une partie positive (BMAL1, CLOCK, NPAS2) et d'une partie négative (CRY, PER) qui sont interconnectées via le récepteur nucléaire orphelin REV-ERB $\alpha$ . Figure adaptée de [3].

Il est à noter que le modèle décrit ci-dessus est encore à l'étude. La possibilité de régulations post-traductionnelles, qui généreraient les variations circadiennes, est notamment actuellement étudiée ([3]).

### 1.1.3 Persistance des rythmes circadiens *in vitro*

Les cellules mammifères immortalisées sont dotées d'une horloge circadienne moléculaire qu'il est possible d'étudier en culture. En l'absence de synchroniseurs extérieurs, les millions de cellules qu'une boîte de Petri contient n'oscillent ni avec la même période, ni avec la même phase ([5], [6]). La mesure de l'expression d'un gène sur une telle population non synchronisée prend donc une valeur constante au cours du temps, qui correspond à la moyenne des niveaux du gène dans les cellules, chacune étant à un stade circadien différent.

La synchronisation des cellules par un choc sérique (exposition à une grande quantité de nutriments [7]), par des substances chimiques ([8]) ou par des cycles de température ([9]) remet à zéro les horloges moléculaires, qui oscillent dès lors en synchronie, avec une période d'environ 24 h. La mesure de rythmes circadiens dans la population de cellules synchronisées est alors possible pendant plusieurs jours, les cellules se désynchronisant peu à peu au cours du temps. L'unité de temps utilisée est alors le CT (Circadian Time), exprimée en heures après le début de la synchronisation.

## 1.2 Chronotoxicité et chronoefficacité des médicaments anticancéreux

L'organisation circadienne de l'organisme entraîne des rythmes de l'efficacité et de la toxicité de nombreux médicaments anticancéreux, selon leur heure d'administration, dans les modèles pré-cliniques, ainsi que chez l'Homme.

### 1.2.1 Dans les modèles pré-cliniques

#### Méthodologie pour l'étude de la chronothérapie chez la souris et le rat

La démonstration expérimentale des changements sur 24 h de la toxicité et de l'efficacité des médicaments anticancéreux implique la synchronisation des souris ou rats, animaux actifs la nuit, par une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (LD12 :12). Ensuite, la même dose de médicament est administrée à différents groupes d'animaux, qui correspondent à différentes heures circadiennes, aussi appelées temps Zeitgeber (ZT). En général, six heures circadiennes, espacées de 4 h, sont testées. Le temps est exprimé en heures ZT ou en heure après le début de la lumière (HALO, Hours After Light Onset). Des équipements spécifiquement dédiés aux études de chronobiologie permettent un contrôle de la lumière différent pour chaque groupe d'animaux placé sur différentes étagères isolées, de sorte que l'étude des stades circadiens

soit effectuée aux horaires adéquats pour l'expérimentateur ([10], figure 1.3).



FIG. 1.3: Dispositifs pour études de chronobiologie chez la souris

### Chronotoxicité des traitements anticancéreux

La tolérance à au moins 40 agents anticancéreux est modifiée par l'heure circadienne d'administration, chez la souris ou le rat ([1]). La survie et la perte de poids maximale dues à l'administration d'une dose potentiellement létale de chacun de ces médicaments varie d'un facteur 2 à 10 selon l'heure d'injection. Ces larges différences sont observées indépendamment du mode d'administration - oral, intraveineux, intra-peritonéal ou intra-artériel- et du nombre ou de la fréquence des administrations ([3]).

La figure 1.4 présente les heures de moindre toxicité et le bénéfice de l'administration chronomodulée pour 16 médicaments anticancéreux chez la souris mâle B6D2F1 (femelle C57BL/6 x mâle DBA2), synchronisée en LD12 :12 ([1]). Les temps optimaux d'administration sont répartis sur la période de 24h et ne peuvent pas être prédits par l'appartenance à une classe pharmacologique ou par les principaux organes cibles de toxicité des médicaments.

Les variations circadiennes de la tolérabilité aux agents anticancéreux persistent chez l'animal exposé à une constante lumière, ou à une constante obscurité, ce qui démontre leur endogénéité ([11]). De plus, les agents chimiothérapeutiques administrés de façon combinée présentent une heure de moindre toxicité proche de celle observée lorsqu'ils sont administrés seuls. Ceci fut notamment démontré pour les combinaisons doxorubicin-cisplatine chez le

rat, irinotecan-oxaliplatine et gemcitabine-cisplatine chez la souris B6D2F1, et docetaxel-doxorubicine chez la souris C3H/He ([1]). Le contrôle circadien des déterminants de la chronotoxicité des agents anticancéreux semble donc persister après l'exposition au premier médicament, du moins lorsque celui-ci est donné à son heure de meilleure tolérabilité.

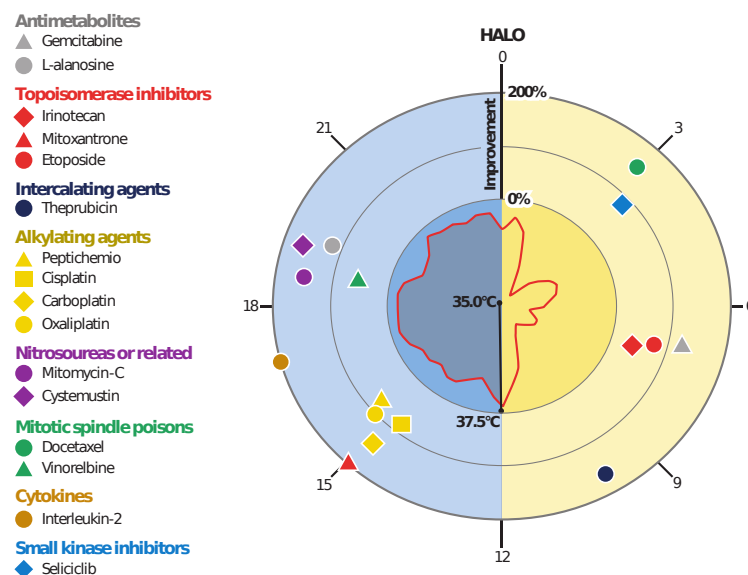


FIG. 1.4: **Influence du temps circadien sur la toxicité des médicaments anticancéreux.** Le diagramme montre la chronotolérance à 16 agents anticancéreux, étudiée chez des souris mâles B6D2F1, synchronisées en LD12 :12. Les pictogrammes sont placés sur le cercle à l'heure de meilleure tolérabilité (de 0 à 24 heures après le début de la lumière (HALO)) ; à une distance du centre du cercle correspondant au bénéfice de survie entre l'heure optimale et la pire heure d'administration (compris entre 0 et 200%). Le rythme circadien moyen de la température corporelle est tracé dans le cercle interne, et est utilisé comme biomarqueur endogène du système circadien. Figure adaptée de [1]

## Chronoefficacité des traitements anticancéreux

L'administration chronomodulée affecte l'efficacité antitumorale d'au moins 28 médicaments anticancéreux chez le rat ou la souris, porteurs de divers types de cancers. La chimiothérapie optimalement dosée et chronomodulée divise au moins par deux la vitesse de croissance tumorale, et augmente significativement la survie des souris porteuses de tumeurs ([1]). La démonstration de cette chronoefficacité est basée sur l'administration durant plusieurs jours ou semaines, d'un seul médicament, ou d'une combinaison d'au plus 4 agents, aux heures circadiennes stipulées ([12]).

La chronoefficacité des agents anticancéreux résulte de différents rythmes circadiens de l'hôte ou de la tumeur ([1]). Tout d'abord, une variation circadienne de l'absorption du médicament dans la tumeur a été démontrée chez le rongeur pour le methotrexate, l'interféron  $\alpha$  et le seliciclib. Ensuite, la pharmacodynamie dans la tumeur peut présenter une rythmicité circadienne se traduisant par des variations de la distribution des phases du cycle cellulaire, des concentrations des protéines cibles (TS pour le 5-FU, TOP1 pour l'irinotecan), et de la quantité de récepteurs (interféron  $\alpha/\beta$ ). Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) présente également une expression rythmée chez les souris porteuses du sarcome 180. Son expression maximale à ZT2 correspond à l'heure de meilleure efficacité antitumorale de trois agents anti-angiogéniques.

La disruption de l'horloge circadienne est cependant fréquemment observée dans les populations de cellules cancéreuses, notamment dans des tumeurs à croissance rapide, ou à un stade avancé de leur évolution ([1]). La transcription du gène Clock n'est plus circadienne dans les tumeurs GOS à un stade avancé, ou dans les adénocarcinomes pancréatiques P03. Aucune organisation circadienne n'est observée dans les cellules en phase S des tumeurs GOS ou dans les carcinomes mammaires MA13C. L'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 est constante dans les MA13C; de même pour la concentration de GSH dans les P03 ([1]).

Néanmoins, la chronoefficacité des agents anticancéreux demeure robuste dans ces modèles expérimentaux. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le système circadien de l'hôte soit à l'origine des variations circadiennes de l'efficacité dans la tumeur. Une autre hypothèse consiste à dire que l'exposition aux médicaments à certaines heures circadiennes induirait une remise à zéro des horloges circadiennes moléculaires dans la tumeur, et donc une synchronisation, ce qui augmenterait l'efficacité antitumorale.

Le schéma circadien d'administration optimale pour la chronoefficacité coïncide généralement avec celui pour la chronotolérance ([1]). Ceci est expérimentalement vérifié pour les combinaisons thérapeutiques irinotecan-oxaliplatine, gemcitabine-cisplatine, et docetaxel-doxorubicine, trois traitements fréquemment utilisés en clinique ([1]). L'explication de cette concordance est encore à l'étude. Une possibilité serait que l'heure circadienne d'administration induisant la plus faible toxicité induise également la plus faible accumulation intracellulaire dans les tissus sains, du fait des rythmes circadiens des transporteurs d'efflux par exemple. Ainsi, la concentration de médicament circulant dans le sang serait plus élevée et les cellules cancéreuses, qui en général présentent peu de rythmes, seraient donc exposées à une plus forte dose.

Ainsi, les études chronothérapeutiques sur des modèles pré-cliniques concluent en faveur d'un intérêt de la chronomodulation circadienne pour l'amélioration des traitements anticancéreux, ce qui a été étudié chez l'Homme.

### 1.2.2 En clinique

Plus d'une centaine d'essais clinique de phase I et II ont étudié la chronothérapeutique des cancers chez des patients atteints de cancers avancés ou métastatiques. Des études randomisées de phase III ont comparé les schémas d'administration chronomodulés à des protocoles administrés indépendamment du temps circadien. Cependant, le patient et les institutions hospitalières contrôlent de façon implicite, les traitements non-chronomodulés, par leur propre rythme circadien ([1]). L'administration constante d'un médicament durant un multiple de 24 h n'est, au contraire, pas influencée par le temps circadien et constitue, de ce fait, un excellent modèle pour la comparaison avec les schémas de chronothérapeutique.

### Technologies d'administration chronomodulée en clinique

La conception de pompes programmables à plusieurs canaux a permis le développement clinique de la chronothérapeutique des cancers. Ces pompes délivrent plusieurs médicaments, selon des schémas préalablement programmés par ordinateur (administration constante, semi-sinusoïdale, linéairement croissante ou décroissante). Elles permettent ainsi un traitement en dehors du milieu hospitalier, qui nécessite peu de soins médicaux et infirmiers.

La première pompe à avoir été développée pour la chronothérapeutique est la pompe IntelliJect<sup>TM</sup> (Aguettant, Lyon, France) qui contient quatre réservoirs de 30 mL. Elle a servi pour l'administration du premier schéma 5-FU-leucovorin-oxaliplatine, permettant ainsi la démonstration de la sûreté et de l'efficacité de cette chimiothérapie chronomodulée. L'approbation par l'Union Européenne et l'Amérique du Nord de la pompe IntelliJect a permis son utilisation pour les chimiothérapies conventionnelles et pour l'évaluation de l'administration chronomodulée de 5-FU-leucovorin-oxaliplatine (chronoflo) lors d'essais cliniques internationaux.

Les pompes Mélodie<sup>TM</sup> (Aguettant, Lyon, France) constituent une seconde génération. Elles présentent de meilleures performances en terme d'autonomie d'énergie, de capacité de réservoirs, de rapidité de programmation, et de flexibilité dans les schémas programmés (Figure 1.5). Ces pompes permettent également une sauvegarde informatique de l'historique des protocoles administrés et des données du patient. Enfin, un dispositif de pompes pré-programmées, à usage unique, est également disponible et approuvé par l'Union Européenne. Bien que prêtes à l'emploi, ces pompes jetables ont





FIG. 1.5: La pompe Mélodie<sup>TM</sup>

un désavantage écologique évident, ainsi qu'un manque de flexibilité dans les profils d'administration. Les pompes Mélodie<sup>TM</sup>, ainsi que les pompes à usage unique, sont actuellement utilisées dans les pratiques hospitalières en oncologie et lors d'essais cliniques multicentriques ([1])

Les médicaments à prise orale semblent également tirer partie de la chronomodulation. En effet, les fluoropyrimidines orales (prodrogues orales du 5-FU) semblent être mieux tolérées lorsque leur exposition systémique a lieu la nuit ([1]). Cependant, l'administration nocturne, lorsque le patient dort, requiert le développement et l'utilisation de dispositifs spécifiques. De nouveaux systèmes d'administration oraux, dits pulsatifs, libèrent le principe actif du médicament un laps de temps prédéterminé après l'ingestion et ont prouvé leur intérêt dans le cas de la chronothérapie ([1]).

### **Chronotolérance et chronoefficacité chez les patients cancéreux**

La plupart des essais cliniques multicentriques compare, de façon randomisée, un schéma chronothérapeutique à une infusion constante mettant en jeu les mêmes doses de médicaments, sur la même durée de traitement.

Deux essais randomisés internationaux de phase III ont comparé le schéma d'administration chronomodulée chronoFLO5 à un schéma constant équivalent, chez 278 patients atteints de cancer colorectal métastatique ([1]). Le schéma ChronoFLO5 consiste en l'administration durant 5 jours consécutifs d'oxaliplatine, de 5-FU et de leucovorine, chaque médicament étant infusé suivant une courbe en cloche d'une durée de 11.5 h, qui atteint son maximum à 16 h pour l'oxaliplatine et 4 h du matin pour le 5-FU et la leucovorine (Figure 1.6). Ces heures circadiennes ont été adaptées d'études expérimentales chez la souris mâle ([3]). L'autre cohorte de patients a reçu les mêmes doses des trois agents thérapeutiques de façon constante durant 5 jours. L'administration chronomodulée a réduit l'incidence des mucites (i.e. inflammation des muqueuses digestives, notamment orales) de grade 3-4 par un facteur 5, et celle des neuropathies sensorielles périphériques (i.e. engourdissement/sensations de brûlure des bouts des doigts des pieds et des mains) d'un facteur 2. Le plus important essai clinique montre aussi une division par 3 du nombre d'hospitalisations dues aux effets toxiques du traitement, avec le schéma chronomodulé ([1]).

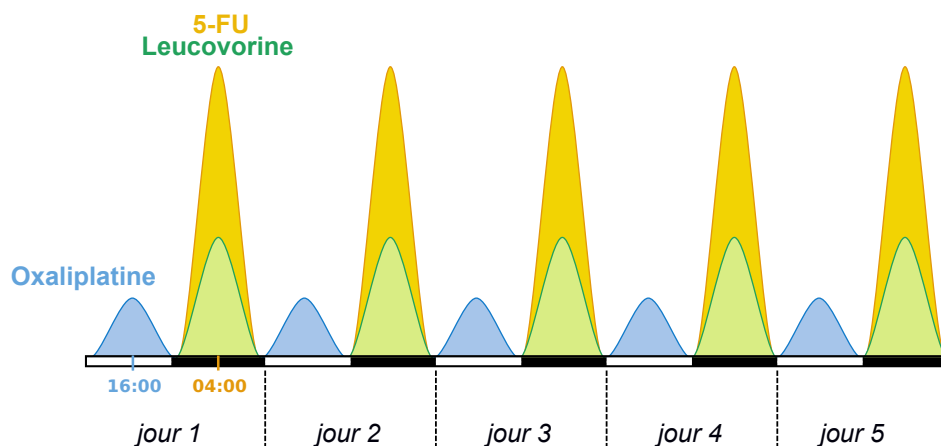


FIG. 1.6: **Schéma d'Administration Chronomodulée ChronoFLO5** Le schéma consiste en l'administration durant 5 jours consécutifs d'oxaliplatine, de 5-FU et de leucovorine, chaque médicament étant infusé suivant une courbe en cloche d'une durée de 11.5 h, qui atteint son maximum à 16 h pour l'oxaliplatine et 4 h du matin pour le 5-FU et la leucovorine.

Dans ces deux essais cliniques, le pourcentage de patients dont les métastases ont régressé de plus de 50 % était de 29% pour la perfusion constante et 51% pour l'administration chronomodulée. Cependant, les taux de survie des deux cohortes de patients n'étaient pas significativement différents. Un troisième essai randomisé a comparé l'administration chronomodulée des mêmes trois médicaments durant 4 jours (chronoFLO4) avec un schéma d'ad-

ministration conventionnel constant sur 2 jours (FOLFOX2) chez 564 patients atteints de cancers colorectaux métastatiques. Le taux de survie suite aux deux régimes d'administration étaient identiques, cependant, le risque de mort précoce sous chronoFLO4 était significativement augmenté de 38% chez les femmes et diminué de 25% chez les hommes, comparé au traitement conventionnel ([1]).

Une récente méta-analyse des trois essais cliniques décrits ci-dessus confirme que la perfusion chronomodulée des trois médicaments produit une efficacité similaire ou moins grande, comparée aux schémas conventionnels chez les femmes. En revanche, chez les hommes, les traitements chronoFLO augmentent significativement la réponse tumorale, ainsi que le taux de survie, comparé aux schémas constants ([13]). Cette influence du genre sur la chronothérapeutique pourrait s'expliquer par des différences entre hommes et femmes au niveau des profils circadiens des expressions géniques. Une autre hypothèse actuellement étudiée consiste à dire que la toxicité sévère chez les femmes entraînerait une disruption circadienne qui annihilerait le bénéfice de la chronothérapie. En effet, l'occurrence de toxicités graves est supérieure de 20 à 50% chez les femmes. De plus, des études préliminaires montrent que les traitements antitumoraux peuvent perturber le rythme d'activité-repos des patients, et cette perturbation est associée à des effets secondaires importants.

Cette méta-analyse met en lumière le besoin de schémas chronomodulés adaptés au profil moléculaire du patient ou de la classe de patient (hommes et femmes, par exemple). Nous proposons ici une approche pluridisciplinaire mathématique et expérimentale pour la personnalisation de la chronothérapie des cancers.

### **1.2.3 Modélisation mathématique pour la personnalisation des traitements chronomodulés**

Les schémas d'administration chronomodulés actuellement utilisés en clinique ont été développés à partir de résultats chez la souris B6D2F1 mâle et semblent présenter un bénéfice thérapeutique pour les patients de sexe masculin. Cependant, les recherches cliniques montrent que chaque patient présente des rythmes circadiens différents, qui influencent leur réponse à la chronothérapie.

Les rythmes circadiens de chaque patient peuvent être mesurés par des méthodes non-invasives telles que l'enregistrement de l'activité-repos, ou le dosage du cortisol dans des prélèvements salivaires à intervalles réguliers sur 24 h ([1]). Les rythmes moléculaires de chaque patient peuvent être déterminés *ex vivo* en utilisant des fibroblastes provenant de biopsies de la peau,

dans lesquels la rythmicité persiste plusieurs heures après prélèvement. Les variations circadiennes de l'expression de *Bmal1* ont ainsi été mesurées par luminescence après transfection des cellules avec un rapporteur lentiviral *Bmal1-luciferase* ([14]).

Nous proposons ici une approche de personnalisation des chronothérapies, au niveau moléculaire, qui combine à la fois des moyens expérimentaux et mathématiques. Le principe consiste en la conception de modèles mathématiques qui seraient calibrés pour chaque patient, ou classe de patients, sur leurs rythmes circadiens des variables biologiques pertinentes. L'utilisation d'algorithmes d'optimisation permettrait ensuite l'élaboration des schémas d'administration optimisés pour le patient, et donc personnalisés.

La conception des modèles mathématiques est possible à partir d'études préliminaires en cultures de cellules et sur des modèles pré-cliniques. La détermination des biomarqueurs à mesurer chez le patient est une étape essentielle nécessaire à cette approche. En effet, les modèles mathématiques ainsi conçus contiennent un grand nombre de paramètres, représentant des vitesses de réactions moléculaires et des rythmes circadiens de gènes et protéines. Seuls quelques uns de ces paramètres pourront être mesurés chez le patient. La modélisation constitue alors un outil d'investigation des variables biologiques ayant un rôle prédominant dans la réponse circadienne aux médicaments, pour chaque patient, ou classe de patients.

Nous proposons une preuve de concept *in vitro* de cette approche combinée expérimentale et modélisatrice (chapitre 2), qui a été adaptée pour la souris (chapitre 3), et a vocation à être transposée pour l'Homme. Nous nous sommes focalisé sur l'optimisation de l'administration chronomodulée du médicament anticancéreux irinotecan.

## 1.3 Le médicament anticancéreux Irinotecan

### 1.3.1 Découverte et usage clinique de l'Irinotecan

Cette thèse se focalise sur l'étude du médicament anticancéreux irinotecan (ou CPT11) et a pour but d'optimiser son administration par une approche combinant la modélisation mathématique et l'expérimentation biologique.

Le CPT11 est approuvé cliniquement depuis 1994 pour le traitement du cancer colorectal. Il fait partie de la famille des camptothécines, dont le principe actif provient de l'arbre chinois *Camptotheca acuminata decne* ([15]). D'autres médicaments anticancéreux sont dérivés de la même molécule, tels

que le topotecan, utilisé dans le traitement du cancer du sein, ou le 9-aminocamptothecin.



FIG. 1.7: **Arbre *Camptotheca acuminata decne.*** Le principe actif de l'irinotecan est extrait de cet arbre chinois.

L'administration chez la souris d'irinotecan est responsable de toxicités parfois sévères pour les systèmes hématologique et digestif. Ces effets non désirés surviennent également chez l'Homme. Les patients traités par irinotecan peuvent aussi présenter une asthénie (i.e. fatigue physique), qui interfère avec leur qualité de vie. La survenue de ces effets secondaires conduit à réduire les doses d'irinotecan, ou à augmenter les intervalles entre les cycles de chimiothérapie, ce qui est évidemment préjudiciable à l'efficacité du traitement. L'amélioration de la tolérance à l'irinotecan constitue ainsi un objectif important qui reste d'actualité dans le traitement des cancers, notamment de la sphère digestive.

### 1.3.2 La pharmacocinétique-pharmacodynamie moléculaire de l'irinotecan

La pharmacocinétique (PK) est "ce que l'organisme fait au médicament", c'est-à-dire comment il le métabolise, ou le transporte par exemple. La pharmacodynamie (PD) est "ce que le médicament fait à l'organisme", en d'autres termes les dommages à l'ADN et la cytotoxicité qu'il induit. Nous décrivons ici les voies moléculaires de la PK-PD de l'irinotecan.

## **Pharmacodynamie : l'irinotecan est un inhibiteur de la topoisomérase 1**

La topoisomérase 1 (TOP1) est une enzyme naturellement présente dans toutes les cellules nucléées. Sa fonction consiste à relaxer les molécules d'ADN sur-enroulées ([16]). En effet, les mécanismes parcourant l'ADN tels que ceux impliqués dans la transcription ou la réplication peuvent augmenter la tension exercée sur les brins d'ADN. La TOP1 se fixe sur l'ADN et coupe un brin de façon transitoire. Celui-ci peut alors effectuer une rotation autour de la molécule d'ADN. Ensuite, la TOP1 se dissocie, permettant ainsi la reconnection du brin coupé. Il est à noter que la quantité de TOP1 reste constante au cours du cycle cellulaire, dans des cultures de cellules non-synchronisées proliférantes ([17]).

L'irinotecan agit en se liant à la TOP1 pour former des complexes CPT11/TOP1/ADN qui ont une plus longue durée de vie que ceux TOP1/ADN. Ces complexes ternaires restent cependant réversibles et peuvent se dissocier spontanément ([16]). Des collisions entre les complexes CPT11/TOP1/ADN et les mécanismes parcourant l'ADN, tels que ceux impliqués dans la transcription ou la réplication, entraînent la formation de dommages à l'ADN irréversibles. Ces dommages prennent la forme de cassures simple- ou double-brin, qui déclenchent les processus de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, et mène possiblement à la mort cellulaire par l'apoptose ([16]).

Le CPT11 semble être capable d'augmenter l'activité de la TOP1 par le biais de la protéine SUMO1 qui exerce une activité catalytique sur la formation de complexes TOP1/ADN ([18], [19]).

## **Pharmacocinétique : métabolisme et transport**

Le CPT11 est une prodrogue qui est activée en son métabolite actif le SN38 par les enzymes carboxylesterases (CES) ([20]). L'activité cytotoxique du SN38 est de 100 à 1000 fois plus élevée que celle du CPT11 ([21], [22]). Le SN38 est désactivé en SN38G par glucuronidation sous l'action de l'UGT1A1 principalement, ainsi que d'autres enzymes UGT1A ([23, 24]). La réaction inverse est catalysée par la  $\beta$  - *glucuronidase* et ne se produit que dans les lignées de cellules cancéreuses qui expriment l'enzyme, et dans l'intestin où celle-ci est produite par la microflore bactérienne([25]). Le CPT11 est converti en deux autres métabolites, APC et NPC, sous l'action des cytochromes P450 3A4/3A5. Seul NPC est activé en SN38 par les carboxylesterases ([20]).

Le CPT11 et le SN38 existent sous forme lactone ou carboxylate, selon le pH de la solution ([26]). Un pH acide favorise la formation de la forme lactone, alors qu'un pH alcalin favorise celle de la forme carboxylate. La

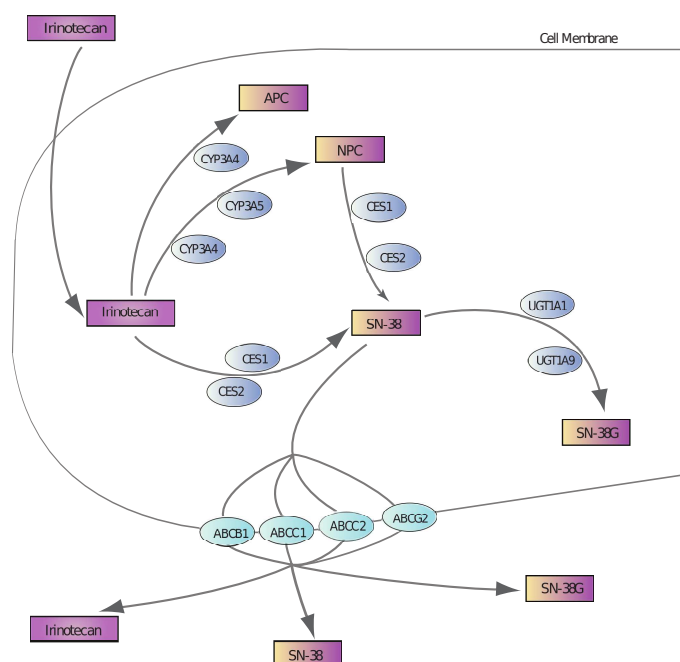


FIG. 1.8: **Représentation schématique de la PK-PD moléculaire de l'irinotecan** L'irinotecan entre passivement dans les cellules et est bioactivé en SN38 par les CESs. Il est également métabolisé en APC et NPC, seul NPC pouvant être transformé en SN38. Le SN38 est ensuite désactivé en SN38G par les enzymes UGT1As. L'irinotecan et ses métabolites sont transportés activement vers le milieu extracellulaire par ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2.

forme carboxylate présente une activité antitumorale moins élevée que la forme lactone ([27, 28]).

L'absorption du CPT11 vers le milieu intracellulaire semble se faire par diffusion passive à travers la membrane cellulaire, comme le suggère l'absence de saturation, pour les concentrations élevées, de l'accumulation intracellulaire pendant 10 min d'exposition ([29, 30]). L'absorption cellulaire du SN38 semble passive pour la forme carboxylate, et possiblement médiée par des mécanismes actifs à bas pH, lorsque la forme lactone est prédominante ([16]).

Le CPT11 et ses métabolites sont activement pompés de l'intérieur vers l'extérieur des cellules par des transporteurs de la famille ABC (ATP-Binding-Cassette). Les transporteurs impliqués dans l'efflux de l'irinotecan sont principalement ABCB1 (Pgp), ABCC1 (MDR1), ABCC2 (MDR2) et ABCG2 (BCRP). Plus précisément, le CPT11 est préférentiellement transporté par ABCB1, ABCC1 et ABCC2; SN38 par ABCG2, ABCC1 et ABCC2; et SN38G par ABCC2 et ABCG2 ([31],[32]).

## Rythmes circadiens des gènes impliqués dans la PK-PD de l'irinotecan

Des variations circadiennes de plusieurs gènes impliqués dans la PK-PD du CPT11 ont été observées chez la souris et en culture de cellules. Ainsi, les cytochromes P450 présentent une rythmicité circadienne dans leur expression génique, protéique et leur activité enzymatique ([33, 34, 35]). L'expression des carboxylesterases 1 et 2 présente une variation circadienne contrôlée à la fois directement par l'horloge circadienne et par les gènes rythmiques DBP, TEF et HLF, dans le foie et le tractus gastro-intestinal ([35, 36, 37]). L'enzyme de désactivation *ugt1a1* présente des rythmes, possiblement induits par la protéine CAR ([38, 39]). Les transporteurs d'efflux *abcb1a*, *abcb1b* et *abcc2* varient rythmiquement dans le foie et l'iléon de la souris ([40, 33, 41], Okyar et al., submitted).

Enfin, la TOP1, cible de l'irinotecan, présente des rythmes circadiens dans son expression génique et protéique chez la souris et en cultures de cellules ([42, 43, 101]). Ces oscillations semblent induites directement par le complexe dimérique CLOCK/BMAL1 ([44]).

Ces rythmes circadiens observés au niveau moléculaire se traduisent par des variations de toxicité et d'efficacité de l'irinotecan, selon son heure d'administration, que nous décrivons ci-après.

### 1.3.3 Chronotoxicité et chronoefficacité de l'irinotecan

#### Chez la souris

Des études réalisées chez la souris mâle B6D2F1 dans notre laboratoire ont montré une rythmicité circadienne de tous les critères de toxicité de l'irinotecan : mortalité, perte de poids, neutropénie, et lésions intestinales coliques. Ainsi, l'administration du médicament, seul ou combiné à l'oxaliplatine est mieux tolérée en fin de phase de repos, à ZT11, chez la souris porteuse ou non de tumeur GOS ([45, 46]). Une chronotolérance similaire a été observée chez des souris mâles ICR par une équipe japonaise qui montre une leucopénie moitié moindre après injection intrapéritonéale à ZT10 en comparaison de ZT22 ([43]).

Chez des souris mâles B6D2F1 porteuses de tumeur GOS, l'administration de l'irinotecan seul ou en combinaison avec l'oxaliplatine s'est montrée plus efficace à ZT7 ou ZT11 ([46]). Au contraire, chez des souris mâles ICR porteuses d'un sarcome S-180, l'activité antitumorale de l'irinotecan s'est révélée supérieure chez les souris traitées à ZT22 en comparaison de celles traitées à ZT10 ([42]). Cette différence de chronoefficacité pourrait s'expliquer par le fait que le sarcome S-180 est une tumeur à croissance lente contrairement aux



tumeurs GOS qui prolifèrent rapidement. Ces différences de taux de croissance pourraient être à l'origine des différences de chronochimiosensibilité observées, comme cela a été théoriquement démontré dans une étude récente ([47]). Dans le sarcome S-180, l'expression du gène Top1 est rythmée, avec un maximum observé à ZT22, ce qui pourrait également expliquer l'activité antitumorale plus élevée à cet horaire.

### **Chez le patient cancéreux**

D'après les données rapportées chez les souris mâles B6D2F1, la meilleure tolérance à ce médicament se situe en fin de phase de repos. L'extrapolation de ces résultats à l'Homme a conduit à la conception d'un schéma chronomodulé d'une durée de 6 h, administré de façon sinusoïdale de 2 :00 à 8 :00 h, avec un pic à 5 :00 h.

Ce schéma chronomodulé a été administré en monothérapie à la dose de 350 mg/m<sup>2</sup>, à des patients atteints de cancer colorectal, dans une étude pilote ([48]), puis dans une étude randomisée, en comparaison avec une administration conventionnelle de 30 min, vers 10 :00 h du matin ([49]). Ces deux études, sur des effectifs réduits (30 et 36 patients, respectivement) ont indiqué une tolérance apparemment meilleure de l'administration chronomodulée, ainsi que des différences importantes de pharmacocinétique et de biotransformation, selon la modalité d'administration ([1]).

L'administration chronomodulée d'irinotécan a ensuite été combinée à chronoFLO4 par voie intraveineuse dans deux essais cliniques et par voie intra-artérielle hépatique dans une étude pilote et dans un essai européen multicentrique en cours (OPTILIV07). Le protocole chronoIFLO par voie veineuse a associé l'irinotécan, au 5-FU-leucovorine et oxaliplatine chez 70 patients dont la tumeur était devenue résistante aux chimiothérapies conventionnelles. Les résultats ont montré la possibilité de contrôle tumoral efficace et durable chez ces patients, et ce avec une tolérance hématologique apparemment meilleure que celle obtenue lorsque cette quadrithérapie était administrée de façon conventionnelle ([50, 51]). Ce schéma éventuellement combiné à l'administration de cetuximab a fait l'objet de plusieurs études cliniques dont les résultats montrent une excellente activité antitumorale et une bonne tolérance en particulier hématologique ([52], Garufi-communication personnelle).

#### **1.3.4 Résistance acquise à l'Irinotécan**

L'exposition au CPT11 peut déclencher des mécanismes de résistance des cellules. Ces mécanismes incluent la modification de la pharmacocinétique du CPT11, qui a pour conséquence une réduction de son accumulation intracellulaire, et donc de son efficacité. La dégradation de la TOP1, qui est la

cible du médicament, est aussi augmentée en réponse au médicament dans certaines lignées de cellules.

### **Surexpression des transporteurs ABC**

Le phénomène de résistance multiple aux médicaments, ou multirésistance, se produit en réaction à l'administration de chimiothérapies. Il est caractérisé par la résistance simultanée des cellules cancéreuses à la plupart des agents antitumoraux. Un mécanisme moléculaire pouvant être à l'origine de cette résistance consiste en l'augmentation induite par le médicament de l'expression des transporteurs ABC, qui pompent les molécules en dehors des cellules ([82]). La surexpression de ces transporteurs d'efflux empêche l'accumulation des agents anticancéreux dans le milieu intracellulaire, diminuant ainsi leur efficacité.

Le CPT11 et ses métabolites sont des substrats de plusieurs transporteurs ABC. L'exposition au CPT11 ou au SN38 induit une surexpression des transporteurs ABCB1 et ABCG2 dans des lignées de cellules cancéreuses et dans les tissus tumoraux chez le patient ([83, 84, 85]). Un mécanisme moléculaire possible menant à l'induction des transporteurs ABC pourrait consister en l'activation, par les dommages à l'ADN dus au CPT11, de facteurs nucléaires capables de promouvoir l'expression des transporteurs ABC. En effet, les cassures double-brin résultant de l'exposition au CPT11 entraînent l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ([86, 87, 88]). En outre, NF- $\kappa$ B activé augmente l'expression de ABCB1 ([89, 90]). De façon similaire, les stress chimiques activent le facteur NRF-2 qui est capable de promouvoir l'expression de ABCG2, ABCC1 et ABCC2 ([91, 92, 93, 94]).

### **Dégradation de la TOP1**

La dégradation protéasomale de la TOP1 induite par l'exposition au CPT11 se produit dans un grand nombre de lignées de cellules saines mais n'est pas ou peu présente dans les cultures de cellules cancéreuses ([53, 54]). Les études *in vitro* suggèrent que la différence de taux de dégradation de la TOP1 aurait lieu en aval de la formation de complexe réversible sur l'ADN ([53]). Cette induction de la dégradation de la TOP1 n'affecte pas l'activité antitumorale du CPT11 dans des cellules de myélomes multiples ([54]).

Ces résultats *in vitro* sont cohérents avec ceux obtenus dans un essai clinique incluant des patients atteints de tumeurs solides ou de leucémies et traités par 9-aminocamptothecin ([55, 56]). Durant la perfusion du médicament, les cellules sanguines périphériques normales prélevées chez les patients avec des tumeurs solides présentaient une dégradation de la TOP1,

alors que la quantité de protéines de TOP1 était inchangée dans les cellules leucémiques prélevées chez patients atteints de leucémie.



## Chapitre 2

# Optimisation de l'exposition circadienne de cultures de cellules Caco-2 à l'irinotecan

### 2.1 Motivations

#### 2.1.1 Preuve de concept *in vitro*

Cette partie présente une preuve de concept *in vitro* de l'approche combinée mathématique et biologique que nous proposons pour la personnalisation de la chronothérapie de l'irinotecan. La PK-PD moléculaire du médicament est ici modélisée et étudiée expérimentalement en culture de cellules, dans le but d'optimiser l'exposition chronomodulée au médicament.

L'irinotecan s'avère à la fois toxique pour la muqueuse du colon, et efficace contre les adénocarcinomes colorectaux. Ainsi, nous avons choisi pour cette étude *in vitro* la lignée de cellules cancéreuses Caco-2, qui sont des cellules épithéliales coliques humaines. Les cellules Caco-2 constituent un modèle bien établi pour l'étude de l'activité des médicaments à la fois sur la physiologie du colon sain, et sur les tumeurs colorectales. De plus, il a précédemment été montré que les cellules Caco-2 expriment les gènes de l'horloge ([60]). Nous avons choisi d'étudier la PK-PD de l'irinotecan sur des cellules quiescentes pour s'affranchir, dans un premier temps, de toute influence du cycle cellulaire sur la réponse circadienne au médicament.

#### 2.1.2 Mise en oeuvre de l'approche combinée

Un modèle mathématique a, tout d'abord, été construit à partir des données de la littérature sur la PK-PD de l'irinotecan dans les cellules Caco-2. Il est constitué d'un système d'équations différentielles ordinaires. Les réactions chimiques sont modélisées, pour la plupart, par la loi d'action de masse,

ou par la cinétique de Michaelis-Menten pour les réactions enzymatiques (cf. chapitre 5). À chaque réaction sont associés un ou plusieurs paramètres qui représentent les vitesses de réaction ou les rythmes circadiens des protéines impliquées.

Les valeurs de ces paramètres sont à déterminer pour notre lignée de cellules Caco-2. Nous avons donc conçu et réalisé des expériences en culture de cellules spécifiquement dédiées à la détermination de ces valeurs de paramètres. La modélisation mathématique guide ainsi le choix des expérimentations.

Les paramètres sont ensuite estimés à partir des résultats biologiques obtenus, par une méthode de bootstrap décrite au chapitre 5. Le modèle mathématique, ainsi calibré, tend à décrire à la fois qualitativement et quantitativement la PK-PD moléculaire de l'irinotecan dans notre lignée de cellules Caco-2. En particulier, il simule la réponse des cellules à différents schémas d'exposition au médicament.

L'utilisation d'algorithmes d'optimisation appliqués au modèle permet ensuite de déterminer les schémas d'exposition à l'irinotecan, théoriquement optimaux pour les cellules Caco-2.

## 2.2 Le modèle mathématique de la PK-PD moléculaire du CPT11

Le modèle de la PK-PD du CPT11 décrit les voies moléculaires ayant lieu dans une population de cellules exposée au médicament. Le système biologique modélisé consiste en 1 million de cellules quiescentes, adhérentes au fond d'une boîte de Petri et recouvertes par le milieu de culture. Nous nommons  $V_{out}$  le volume de ce milieu extracellulaire et le fixons à  $2.5 \cdot 10^{-3}$  L.  $V_{in}$  est le volume intracellulaire, égal au volume d'une seule cellule, multiplié par le nombre de cellules, ici 1 million. Le volume moyen d'une cellule a été expérimentalement déterminé à  $8 \cdot 10^{-12}$  L pour les Caco-2 (cf. chapitre 6).  $V_{in}$  est donc égal à  $8 \cdot 10^{-6}$  L.

Le modèle mathématique calcule pour chaque schéma d'exposition, la cytotoxicité qu'il induit dans les cellules. L'activité de l'irinotecan est ici évaluée par la variable mathématique  $I_{compl}$  qui représente la concentration de dommages à l'ADN irréversibles. En effet, cette quantité est expérimentalement corrélée à la cytotoxicité du médicament à la fois *in vitro* dans une dizaine de lignées de cellules, et *in vivo* ([61, 62, 63]). Cette corrélation a également été montrée pour d'autres médicaments anticancéreux, tels que l'oxaliplatine ([64]).

Les variables mathématiques représentent des concentrations dans le compartiment extracellulaire, ou des concentrations intracellulaires moyennées sur la population de cellules. Elles sont exprimées en  $\mu\text{ M}$  ( $=\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). En voici une description détaillée :

- $[CPT_{out}]$  = concentration extracellulaire de CPT11.
- $[CPT_{in}]$  = concentration intracellulaire de CPT11.
- $[CES]$  = concentration de carboxylestérases.
- $[SN_{out}]$  = concentration extracellulaire de SN38.
- $[SN_{in}]$  = concentration intracellulaire de SN38.
- $[UGT]$  = concentration d'enzymes UGT1As.
- $[SNG_{out}]$  = concentration extracellulaire de SN38G.
- $[SNG_{in}]$  = concentration intracellulaire de SN38G.
- $ABC\_CPT, ABC\_SN$  = concentrations des transporteurs d'efflux du CPT11 et du SN38.
- $[DNA_{free}]$  = concentration d'ADN libre (i.e. non complexé avec la TOP1).
- $[TOP1]$  = concentration de TOP1.
- $[DNA/TOP1]$  = concentration de complexes binaires DNA/TOP1.
- $[CompI]$  = concentration de complexes ternaires DNA/TOP1/SN38.
- $[Icompl]$  = concentration de dommages irréversibles à l'ADN (cassures simple- et double-brin).

Les voies moléculaires de la PK-PD de l'irinotecan dans les cellules Caco-2 ont, tout d'abord, été modélisées à partir des données biologiques de la littérature.

### 2.2.1 Modélisation de la pharmacocinétique

Nous détaillons ici la modélisation du transport et de la métabolisation du CPT11 par les cellules.

L'absorption du CPT11, du SN38 et du SN38G par les cellules est supposée passive puisque ces molécules sont majoritairement sous leur forme carboxylate au pH des expériences (pH 7.8) ([29, 30]). Elle est modélisée comme une diffusion à travers la membrane cellulaire, de l'extérieur vers l'intérieur des cellules (cf. chapitre 5).

L'efflux du CPT11 et de ses métabolites est, quant à lui, actif puisque le médicament est pompé vers le milieu extracellulaire par des transporteurs ABC. Il suit une cinétique de Michaelis-Menten, comme cela a été expérimentalement démontré ([65, 66]). Les transporteurs responsables de l'efflux du CPT11 ont été notés  $ABC\_CPT$ . Par souci de simplification, nous avons supposé que le SN38 et le SN38G étaient efflués par les mêmes transporteurs, notés  $ABC\_SN$ . Ces deux variables mathématiques modélisent la somme de toutes les molécules capables de transporter le CPT11, le SN38

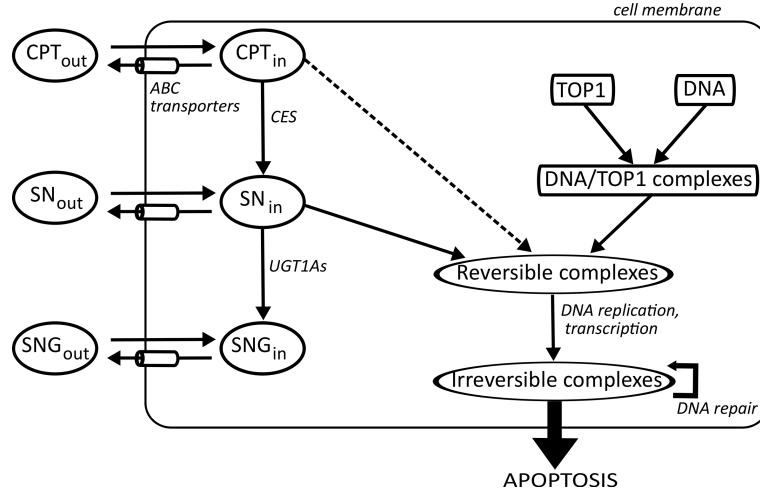


FIG. 2.1: **Voies moléculaires considérées de la PK-PD de l'irinotecan dans les cellules Caco-2.** Le CPT11 dans le milieu extracellulaire ( $CPT_{out}$ ) diffuse passivement à travers la membrane cellulaire et pénètre dans le compartiment intracellulaire ( $CPT_{in}$ ). Il est ensuite activé en SN38 ( $SN_{in}$ ) par les CESs. Le SN38 est désactivé en SN38G ( $SNG_{in}$ ) sous l'action d'enzymes UGT1As.  $CPT_{in}$ ,  $SN_{in}$  et  $SNG_{in}$  sont expulsés vers l'extérieur des cellules par des transporteurs ABC ( $CPT_{out}$ ,  $SN_{out}$ ,  $SNG_{out}$ ). La TOP1 est une enzyme dont la fonction est de diminuer la tension présente dans les molécules d'ADN. Pour se faire, elle crée des complexes transitoires DNA/TOP1, que  $SN_{in}$  stabilise en complexes ternaires DNA/TOP1/SN38, qui sont encore spontanément réversibles. Leur collision avec des mécanismes parcourant l'ADN provoque des lésions irréversibles à l'ADN qui déclenche les processus de réparation de l'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire le cas échéant, et mène possiblement la cellule à l'apoptose.

et le SN38G.  $ABC\_CPT$  représente principalement l'activité de ABCB1, ABCC1, et ABCC2; et  $ABC\_SN$  celle de ABCC1, ABCC2 et ABCG2. La diffusion des molécules de l'intérieur vers l'extérieur des cellules est ici négligée.

Le CPT11, une fois dans le cytoplasme, est bioactivé en son métabolite actif, le SN38, sous l'action enzymatique de CES, représentant la somme de toutes les carboxylestérases fonctionnelles. Cette activation suit une cinétique de Michaelis-Menten comme expérimentalement mis en évidence ([21, 22, 25]). Les équations gouvernant les concentrations de CPT11 peuvent donc s'écrire :

$$\frac{d[CPT_{out}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upCPT}[CPT_{out}] + \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}]} \quad (2.1)$$

$$\frac{d[CPT_{in}]}{dt} = k_{upCPT}[CPT_{out}] - \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}]} - \frac{V_{ces}[CES][CPT_{in}]}{K_{ces} + [CPT_{in}]} \quad (2.2)$$



Le SN38 est désactivé en SN38G sous l'action de UGT, qui représente la somme de toutes les enzymes UGT1As capables de catalyser la réaction. Cette désactivation suit une cinétique de Michaelis-Menten, comme expérimentalement démontrée ([22, 24, 67]). Les concentrations de SN38 suivent donc les cinétiques suivantes :

$$\frac{d[SN_{out}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upSN}[SN_{out}] + \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{in}]}{K_{effSN} + [SN_{in}]} \quad (2.3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[SN_{in}]}{dt} = & k_{upSN}[SN_{out}] - \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{in}]}{K_{effSN} + [SN_{in}]} + \frac{V_{ces}[CES][CPT_{in}]}{K_{ces} + [CPT_{in}]} \\ & - \frac{V_{ugt}[UGT][SN_{in}]}{K_{ugt} + [SN_{in}]} - k_{f2}[DNATOP1][SN38_{in}] + k_{r2}[Compl] \end{aligned} \quad (2.4)$$

Le SN38G étant un métabolite inactif du CPT11, il ne joue aucun rôle sur la sortie du modèle qui est la cytotoxicité du médicament. Ses concentrations intra- et extracellulaires ne seront donc pas calculées lors des procédures d'optimisation thérapeutique décrites dans les sections suivantes. Elles peuvent être simulées par les deux équations suivantes dans lesquelles les paramètres de transport du SN38G sont supposés égaux à ceux du SN38, dans le but de limiter le nombre de paramètres du modèle :

$$\frac{d[SN_{Gout}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upSN}[SN_{Gout}] + \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{Gin}]}{K_{effSN} + [SN_{Gin}]} \quad (2.5)$$

$$\frac{d[SN_{Gin}]}{dt} = k_{upSN}[SN_{Gout}] - \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{Gin}]}{K_{effSN} + [SN_{Gin}]} + \frac{V_{ugt}[UGT][SN_{in}]}{K_{ugt} + [SN_{in}]} \quad (2.6)$$

La voie de métabolisation par les cytochromes P450 n'est pas modélisée car elle a été démontrée inactive dans la plupart des lignées Caco-2 ([68]).

Bien que la quantité totale de médicament reste théoriquement constante, nous avons décidé de ne pas utiliser cette loi de conservation dans notre modélisation mathématique et résolvons donc une équation différentielle de plus. En effet, d'une part, nous ne modélisons peut-être pas toutes les voies de métabolisations du CPT11 effectivement actives. D'autre part, les mesures expérimentales des concentrations de médicaments pourraient ne pas s'avérer assez précises pour retranscrire cette loi théorique.

### 2.2.2 Modélisation de la pharmacodynamie

Nous modélisons maintenant l'activité cytotoxique de l'irinotecan, qui est un inhibiteur de la TOP1.

Une unité d'ADN est ici définie comme un site de liaison à la TOP1. En effet, la TOP1 se lie à l'ADN au niveau de site spécifique. Nous supposons que ces sites apparaissent sur l'ADN toutes les  $k_{entry}$  paires de bases,  $k_{entry}$  étant un paramètre à estimer. La variable  $DNA_{free}$  représente la concentration de sites de liaison libres. Une molécule de TOP1 peut s'insérer au niveau de ce site et ainsi former un complexe  $DNA/TOP1$ , qui est spontanément réversible. Cette réaction est modélisée par une loi d'action de masse (cf. chapitre 5)

La capacité du CPT11 à interagir avec la TOP1 est négligée et le SN38 est la seule molécule du modèle qui se lie aux complexes DNA/TOP1. Les complexes ternaires DNA/TOP1/SN38 (*Compl*), ainsi formés, peuvent se dissocier spontanément. Leur collision avec des mécanismes parcourant l'ADN, tels que ceux de la réplication ou de la transcription, entraîne la formation de dommages irréversibles à l'ADN (*Icompl*). La cinétique des réactions décrites ci-dessus suit une loi d'action de masse ([69]). Voici les équations modélisant la PD du CPT11 :

$$\frac{d[TOP1]}{dt} = k_{ftop} - k_{dtop}[TOP1] - k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] + k_{r1}[DNA/TOP1] + k_{r2}[Compl] \quad (2.7)$$

$$\frac{d[DNA/TOP1]}{dt} = k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] - k_{f2}[DNA/TOP1][SN_{in}] - k_{r1}[DNA/TOP1] \quad (2.8)$$

$$\frac{d[Compl]}{dt} = k_{f2}[DNA/TOP1][SN_{in}] - k_{r2}[Compl] - k_{Irr}[Compl] \quad (2.9)$$

$$\frac{d[Icompl]}{dt} = k_{Irr}[Compl] \quad (2.10)$$

La quantité totale d'ADN est considérée constante puisque les cellules sont quiescentes. Cette loi de conservation est utilisé pour calculer la concentration de molécules d'ADN libre :  $DNA_{free} = DNA_{tot} - [DNA/TOP1] - [Compl] - [Icompl]$ .

Nous supposons que la vitesse de formation des dommages irréversibles à l'ADN  $k_{Irr}$  est constante, ce qui implique que la quantité et la vitesse des mécanismes parcourant l'ADN le sont aussi. Cette hypothèse est réaliste dans la mesure où nous modélisons des cellules quiescentes. Dans le cas de cellules proliférantes,  $k_{Irr}$  devrait prendre une valeur plus grande au moment de la phase de synthèse de la cellule, lorsque de nombreuses fourches de réplication parcourent l'ADN.

### 2.2.3 Modélisation de la rythmicité circadienne des protéines

Conformément aux résultats expérimentaux de la littérature, nous supposons que les enzymes d'activation (CES), de désactivation (UGT), les trans-

porteurs ABC ( $ABC\_CPT$ ,  $ABC\_SN$ ) et la cible du médicament (TOP1) présentent des rythmes circadiens dans leur expression protéique. La concentration intracellulaire de ces protéines est modélisée comme la somme d'une dégradation constante ( $k_d$ ) et d'une traduction circadienne des ARN messagers correspondants. Cette traduction prend la forme d'un cosinor où M est la valeur moyenne des oscillations, A leur amplitude, T leur période, et  $\phi$  leur phase :

$$\frac{d[Protein]}{dt} = M + A \cos\left(\frac{2\pi}{T}(t - \phi)\right) - k_d[Protein] \quad (2.11)$$

Il est à noter que cette équation modélise la quantité de protéines fonctionnelles, les protéines incapables d'accomplir leur rôle n'étant pas représentées. Ainsi, ces rythmes circadiens de quantités de protéines peuvent aussi être interprétés comme les rythmes d'activité des enzymes.

### État initial du système

À l'instant initial, le CPT11 est ajouté au milieu extracellulaire :

$$\begin{aligned} CPT_{out}(0) &= C_{tot} \\ CPT_{in}(0) &= 0 \\ SN_{out}(0) &= 0 \\ SN_{in}(0) &= 0 \\ SNG_{out}(0) &= 0 \\ SNG_{in}(0) &= 0 \\ Compl(0) &= 0 \\ Icompl(0) &= 0 \end{aligned}$$

où  $C_{tot}$  est la concentration initiale du CPT11 dans le milieu extracellulaire.

La TOP1, les complexes DNA/TOP1 et l'ADN sont à l'équilibre :

$$TOP1(0) = \frac{k_{f_{top}}}{k_{d_{top}}} \quad (2.12)$$

$$DNATOP1(0) = \frac{B}{1+B} DNA_{tot} \quad (2.13)$$

$$DNA(0) = DNA_{tot} - DNATOP1(0) \quad (2.14)$$

où  $B = \frac{k_{f1}}{k_{r1}} \frac{k_{f_{top}}}{k_{d_{top}}}$

### 2.2.4 États d'équilibre

Nous recherchons ici les états stationnaires du modèle mathématique dans le cas où les concentrations de CES, UGT,  $ABC\_CPT$ ,  $ABC\_SN$  et TOP1 sont constantes, ceci correspondant à l'étude de cellules non synchronisées (cf. chapitre 1).

Le système dynamique est à l'équilibre lorsque toutes ses variables sont constantes, c'est-à-dire lorsque toutes les dérivées sont nulles. Le modèle admet les états stationnaires suivants :

$$\begin{aligned}
CPT_{out}^* &= 0 \\
CPT_{in}^* &= 0 \\
SN_{out}^* &= 0 \\
SN_{in}^* &= 0 \\
SNG_{out}^* &= \frac{V_{effSN}[ABC\_SNG]SNG_{in}^*}{k_{uptSN}(K_{effSN} + SNG_{in}^*)} \\
SNG_{in}^* &= 0 \\
Compl^* &= 0 \\
Icompl^* &= 0 \\
TOP1^* &= \frac{k_{ftop}}{k_{dtop}} \\
DNA/TOP1^* &= \frac{B}{1+B} DNA_{tot} \\
DNA_{free}^* &= DNA_{tot} - DNATOP1^* - Icompl^*
\end{aligned}$$

où  $B = \frac{k_{f1}}{k_{r1}} \frac{k_{ftop}}{k_{dtop}}$

Une valeur d'équilibre de  $Icompl^*$  peut être calculée en utilisant la loi de conservation de la quantité totale de médicament :

$$Icompl^* = C_{tot} \frac{V_{out}}{V_{in}} - SNG_{in}^* - SN38G_{out}^* \frac{V_{out}}{V_{in}}$$

Dans ces états stationnaires, le médicament est soit désactivé en SN38G, soit en complexes irréversibles avec l'ADN et la TOP1. En réalité, seul environ 10% du CPT11 est activé en SN38, ce qui signifie que ces états stationnaires théoriques ne seront jamais atteints expérimentalement.

De façon plus générale, l'administration d'un agent cytotoxique constitue une perturbation d'un système biologique à l'équilibre. Le retour à un état stationnaire ne peut se faire que si le système biologique parvient à éliminer totalement le médicament, ou bien s'il est tué par celui-ci. La seule étude des états stationnaires semble donc insuffisante dans une perspective d'optimisation thérapeutique.

Une étude cinétique du modèle mathématique paraît alors appropriée. Pour décrire de façon réaliste cette cinétique, il nous faut déterminer les valeurs des paramètres du système. Nous décrivons ci-après l'étude expérimentale sur culture de cellules Caco-2 qui a pour but la quantification de ces valeurs de paramètres.

## **2.3 Étude expérimentale de la PK-PD de l'irinotecan sur des cellules Caco-2**

Une fois le modèle mathématique construit selon les données de la littérature, nous avons entrepris l'étude expérimentale de la PK-PD de l'irinotecan dans les cellules Caco-2. Les expériences biologiques réalisés dans notre lignée de cellules ont pour but, d'une part, de vérifier qualitativement l'activité des différentes voies moléculaires et, d'autre part, de déterminer quantitativement leur vitesse afin d'estimer les paramètres du modèle mathématique.

### **2.3.1 PK-PD du CPT11 dans des cellules non-synchronisées**

La PK-PD du CPT11 a tout d'abord été étudiée dans des cellules Caco-2 non synchronisées.

#### **Méthodes expérimentales**

Quatre jours après l'obtention de la confluence, les cellules Caco-2 ont été exposées au CPT11 aux concentrations indiquées. Les mesures de concentrations intra et extracellulaires ont été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Pour l'étude de l'inhibition de transport, les cellules ont été pré-incubées, 24h avant l'exposition au CPT11, avec du verapamil (100  $\mu$ M), un inhibiteur non spécifique des transporteurs ABC ([70]). Nous renvoyons au chapitre 6 pour une description détaillée du matériel et des méthodes utilisés.

#### **Métabolisme et transport**

Les cellules non-synchronisées ont tout d'abord été exposées durant 48 h au CPT11 à une concentration de 115  $\mu$ M, en présence ou non de verapamil, un inhibiteur non-spécifique de transporteurs ABC. L'objectif de cette expérience est, tout d'abord, de vérifier la métabolisation du CPT11 en SN38, et l'implication des transporteurs ABC dans son efflux. Ces résultats nous permettront également une quantification de l'accumulation du CPT11 dans les cellules Caco-2, en vue de l'estimation des paramètres du modèle mathématique.

Le CPT11 s'est accumulé dans les cellules Caco-2 et approximativement 0.1% de sa quantité totale a été bioactivé en SN38 (Figure 2.2). La présence de verapamil a fortement favorisé cette accumulation intracellulaire et faiblement diminué la concentration extracellulaire de CPT11. Ces résultats confirment l'efflux actif du CPT11, possiblement effectué par ABCB1, ABCC1, et ABCC2, trois transporteurs inhibés par le verapamil.

L'augmentation de la concentration intracellulaire du CPT11 en présence de verapamil a résulté en une plus importante production de SN38. Néanmoins, la concentration intracellulaire de SN38 n'a pas été modifiée par la présence du verapamil, seule la concentration extracellulaire de SN38 a été augmentée.

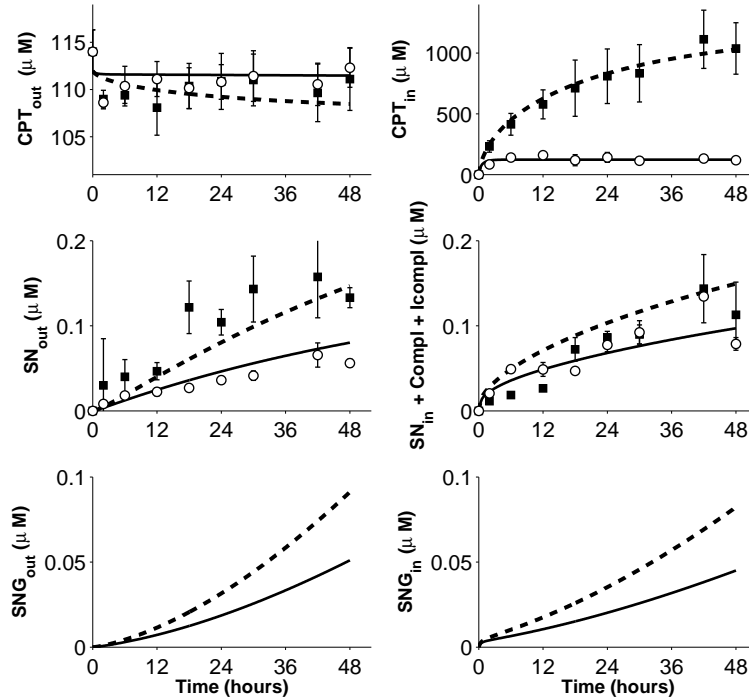


FIG. 2.2: Évolution temporelle des concentrations extra et intracellulaires du CPT11, SN38 et SN38G durant l'exposition au CPT11. Les concentrations en absence ( $\circ$ ) ou présence ( $\blacksquare$ ) de verapamil sont les moyennes de quatre points de données, provenant de deux expériences indépendantes ( $\pm$  SEM). Les lignes continues et pointillées correspondent aux simulations du modèle mathématique, calibré aux données, en absence ou présence de verapamil respectivement. **A,B,C** : concentrations extracellulaires de CPT11, SN38 et SN38G ; **D, E, F** : concentrations intracellulaires de CPT11, SN38 et SN38G (pour le SN38, somme des molécules libres et liées à l'ADN).

## Absorption cellulaire du médicament

Pour étudier l'absorption du CPT11, les cellules ont été exposées durant 10 min à 40, 60, 80 et 100  $\mu$  M. En effet, pour mettre en évidence l'entrée du médicament, et la différencier de sa sortie active, nous faisons l'hypothèse qu'il n'y a pas encore d'efflux durant les dix premières minutes ([26, 29, 30]). Ainsi, la concentration intracellulaire n'est le résultat que d'une entrée passive du médicament dans les cellules.

La concentration intracellulaire de CPT11 après 10 min d'exposition augmente avec la concentration extracellulaire initiale du médicament (Figure 2.3). L'absence de saturation suggère une entrée passive du médicament par diffusion à travers la membrane cellulaire.

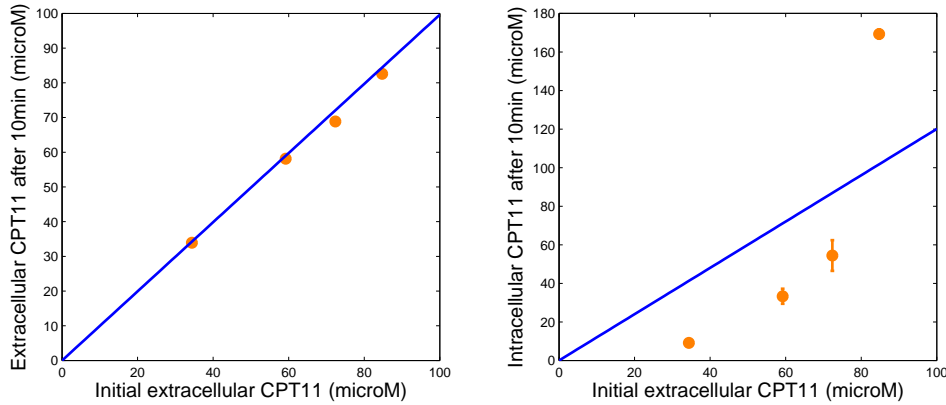


FIG. 2.3: **Concentrations extra et intracellulaires de CPT11 après 10 min d'exposition, dans des cellules Caco-2 non synchronisées.** Les points oranges sont la moyenne  $\pm$  SEM de deux points de données provenant de la même expérience. La courbe bleue est le modèle d'approximation de l'absorption du CPT11 présenté à la section 2.4.

## Accumulation intracellulaire du CPT11

Nous mesurons ici l'accumulation intracellulaire du CPT11 à différentes doses, dans le but de caractériser les paramètres d'efflux du CPT11. En effet, les mesures expérimentales présentées ci-dessus vont nous permettre de calculer le paramètre d'absorption ; et ces mesures d'accumulation intracellulaire nous permettront une détermination indirecte du transport actif du CPT11 (cf. section 2.4).

Les cellules Caco-2 ont été exposées pendant 48 h à 10 et 40  $\mu$ M de CPT11. Le CPT11 s'est faiblement accumulé dans les cellules puisque les concentra-

tions intracellulaires sont environ 10 fois plus petites que les concentrations extracellulaires (Figure 2.4).

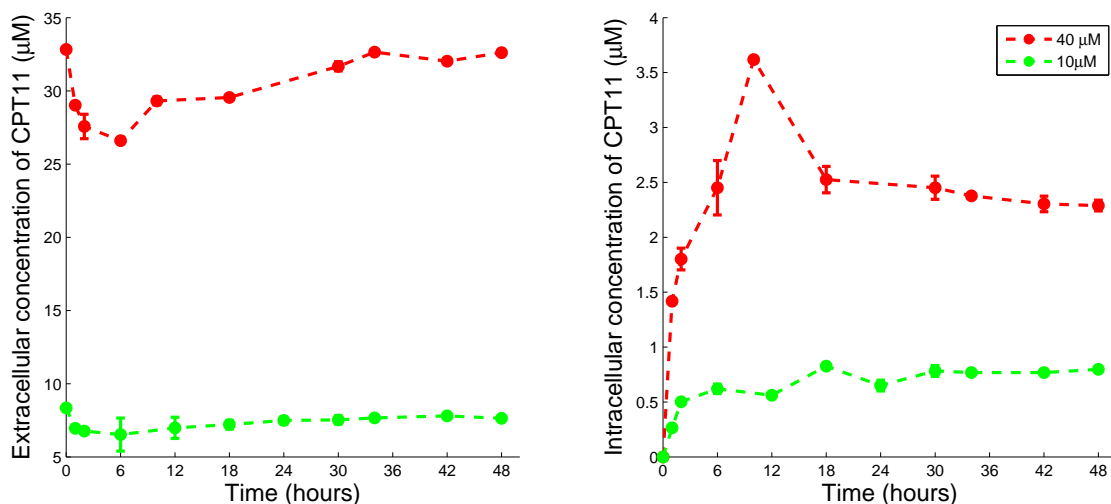


FIG. 2.4: Concentrations extra et intracellulaires de CPT11 après 48 h d'exposition, dans des cellules Caco-2 non synchronisées. Moyenne  $\pm$  SEM de deux points de données provenant d'une même expérience.

Pour les expériences présentées dans les deux derniers paragraphes (absorption et accumulation du CPT11), le nombre de cellules par boîte de Petri n'a pas été mesuré. Les résultats bruts d'HPLC, qui dépendent de la quantité de cellules par boîte n'ont donc pas pu être normalisés à 1 million de cellules (cf. chapitre 6). Ce manque d'information induit une imprécision non négligeable pour les mesures de concentrations intracellulaires, pouvant aller jusqu'à  $\pm 60\%$ . Pour cette raison, ces expériences n'ont servi qu'à déterminer un intervalle de valeurs plausibles pour les paramètres concernés, les valeurs définitives étant déduites de l'étape finale de l'estimation de paramètres (cf. section 2.4).

### 2.3.2 Contrôle circadien de la PK-PD du CPT11 dans des cellules synchronisées

Les résultats expérimentaux présentés dans cette partie sont réalisées sur cultures de cellules Caco-2 synchronisées par un choc sérique (cf. chapitre 6).



## Méthodes expérimentales

Quatre jours après confluence, les cellules ont subies un choc sérique et ont été récupérées aux CT indiqués. Les expressions d'ARN messagers ont été mesurées par RT-PCR quantitative. La quantité de protéines de la TOP1 a été mesurée dans le noyau et le cytoplasme des cellules par Western Blot. L'activité de la TOP1 a été mesurée par l'utilisation du kit Topo I Link (TopoGen, Port Orange, FL). La viabilité cellulaire a été déterminée par le kit CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI), l'apoptose par le kit Caspase-Glo (Promega, Madison, WI). Les analyses de variance ont été réalisées par des tests ANOVA en utilisant le logiciel SPSS (IBM, Somers, NY). Les analyses Cosinor ont été effectuées comme décrites dans [101]. Nous renvoyons au chapitre 6 pour une description détaillée du matériel et des méthodes utilisés.

## Expression des gènes de l'horloge et de la PK-PD du CPT11

Trois gènes de l'horloge (*REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, *BMAL1*) et 7 gènes de la pharmacologie de l'irinotecan (*TOP1*, *UGT1A1*, *CES2*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*) ont présenté un rythme circadien dans leur expression d'ARN messagers, dans des cellules Caco-2 synchronisées (Figure 2.5). La modélisation mathématique par l'équation 2.15 (cf. ci-après) a permis de déterminer une période commune de 26 h 50 (SD 63 min). L'amplitude circadienne de la *CES2* est faible à cause d'une grande variabilité entre les expériences (Tableau 2.1). Le choc sérique a induit une surexpression non-circadienne, durant les premières heures après le choc, de tous les gènes, exceptés *BMAL1* et *CES2*.

L'évolution temporelle des ARN messagers dans les cellules Caco-2 synchronisées a été modélisée par un cosinus amorti :

$$ARN(t) = R + e^{-\lambda t}(P + S \cos(\frac{2\pi}{T}(t - \phi))) \quad (2.15)$$

Le facteur d'amortissement  $e^{-\lambda t}$  est à la fois appliqué au cosinus, pour représenter la désynchronisation des cellules au cours du temps, et à  $P$ , pour modéliser la surexpression initiale due au choc sérique. Les deux amortissements sont supposés égaux dans un souci de simplification.  $R$  représente la quantité d'ARN avant le choc sérique vers laquelle le modèle converge en temps long. Nous avons supposé une période commune pour tous les gènes qui correspond à la période intrinsèque de la population de cellules. Cette période  $T$ , ainsi que les paramètres  $R$ ,  $\lambda$ ,  $P$ ,  $S$ , et  $\phi$  de chaque gène ont été estimés simultanément pour tous les ARN par une méthode de bootstrap (cf. chapitre 5). Les valeurs de paramètres obtenus sont exposées au tableau 2.1.

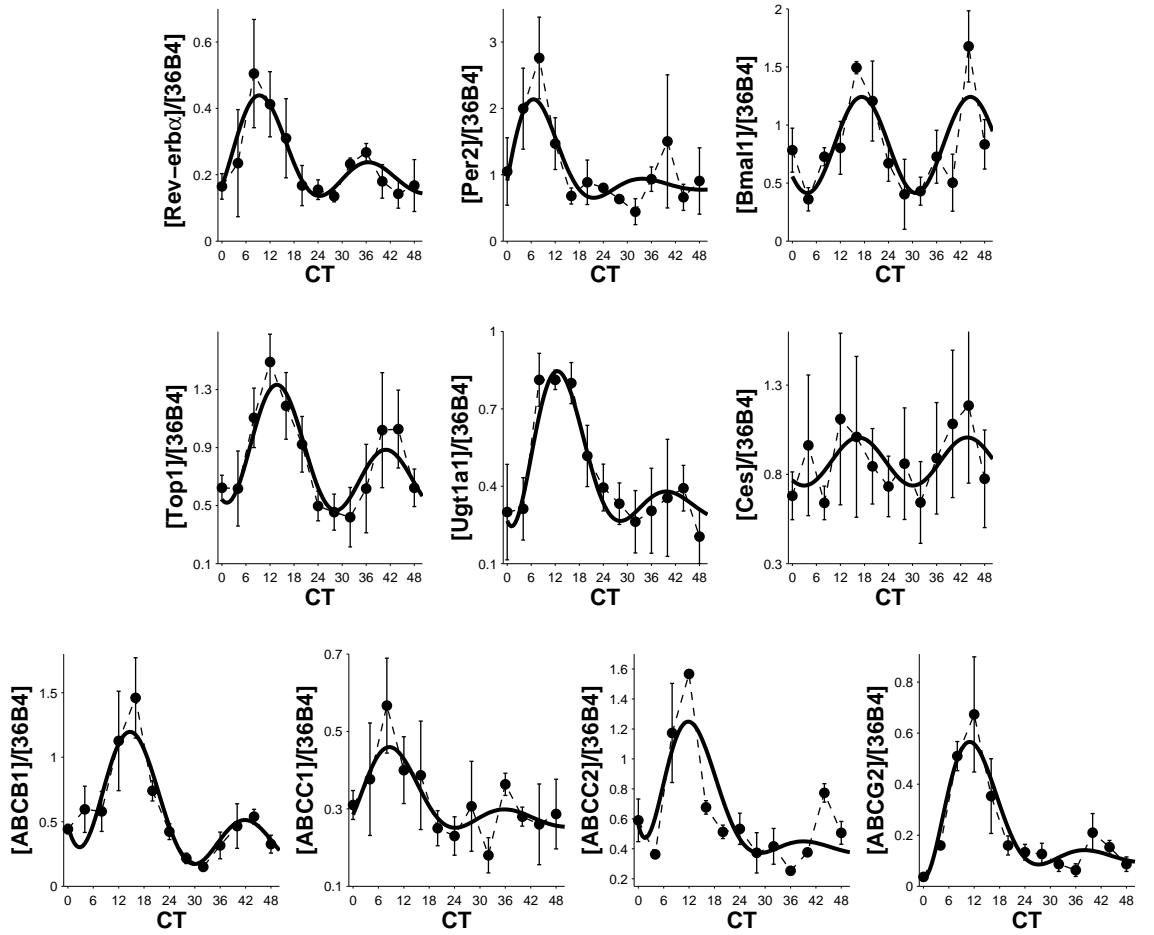


FIG. 2.5: Rythme circadien des expressions de gènes de l'horloge et de la pharmacologie de l'irinotecan dans des cellules Caco-2 synchronisées. La quantité d'ARN messagers de 3 gènes de l'horloge (*REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, *BMAL1*) et 7 gènes de la PK-PD de l'irinotecan (*TOP1*, *UGT1A1*, *CES2*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*) présentent des variations circadiennes d'une période de 26 h 50 (SD 63 min). Les résultats expérimentaux sont la moyenne ( $\pm$  SEM) de quatre expériences indépendantes pour *REV-ERB $\alpha$* , *TOP1*, *UGT1A1*, et *CES2*, et de 3 expériences indépendantes pour *PER2*, *BMAL1*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, et *ABCG2*. Les courbes continues correspondent à l'équation 2.15 ajustée aux données (cf. Tableau 2.1 pour les valeurs de paramètres).

	$\lambda$ (h <sup>-1</sup> )	$P$ (a.u.)	$S$ (a.u.)	$\phi$ (h, min)	$R$ (a.u.)
<i>REV – ERB<math>\alpha</math></i>	$0.04 \pm 0.01$	$0.21 \pm 0.06$	$0.24 \pm 0.05$	10 h 41 $\pm$ 71 min	$0.14 \pm 0.03$
<i>PER2</i>	$0.08 \pm 0.01$	$0.83 \pm 0.52$	$1.65 \pm 0.5$	8 h 37 $\pm$ 74 min	$0.79 \pm 0.18$
<i>BMAL1</i>	0	$0.83 \pm 0.07$	$0.41 \pm 0.09$	17 h 04 $\pm$ 75 min	0
<i>TOP1</i>	$0.02 \pm 0.01$	$0.7 \pm 0.2$	$0.59 \pm 0.15$	14 h 30 $\pm$ 96 min	$0.41 \pm 0.11$
<i>UGT1A1</i>	$0.06 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.13$	$0.68 \pm 0.16$	14 h 32 $\pm$ 65 min	$0.27 \pm 0.06$
<i>CES2</i>	0	$0.87 \pm 0.04$	$0.13 \pm 0.05$	16 h 40 $\pm$ 176 min	0
<i>ABCB1</i>	$0.03 \pm 0.01$	$1.06 \pm 0.24$	$0.84 \pm 0.3$	15 h 58 $\pm$ 60 min	$0.09 \pm 0.08$
<i>ABCC1</i>	$0.06 \pm 0.02$	$0.17 \pm 0.09$	$0.18 \pm 0.07$	10 h 28 $\pm$ 144 min	$0.25 \pm 0.05$
<i>ABCC2</i>	$0.08 \pm 0.004$	$1.44 \pm 0.27$	$1.32 \pm 0.23$	14 h 50 $\pm$ 51 min	$0.36 \pm 0.05$
<i>ABCG2</i>	$0.08 \pm 0.007$	$0.63 \pm 0.13$	$0.69 \pm 0.12$	13 h 36 $\pm$ 43 min	$0.09 \pm 0.02$

TAB. 2.1: Valeurs de paramètres des expressions circadiennes de gènes dans des cellules Caco-2 synchronisées. Moyenne  $\pm$  SD, estimée en calibrant l'équation 2.15 aux données expérimentales par une méthode de bootstrap (cf. chapitre 5), a.u.= arbitrary units.

Les ARN messagers de CES2, TOP1, UGT et REV-ERB $\alpha$  ont été quantifiés au cours de quatre expériences indépendantes entre lesquelles une variabilité est à noter (Figure 2.6). L'expression génique de CES2 a présenté des rythmes circadiens dans les expériences 1, 2 et 4, d'une amplitude de 15%, 29%, et 28% de leur valeur moyenne respectivement. Au contraire, aucun motif circadien n'est observé pour la quantité d'ARN de CES2 dans l'expérience 3. La surexpression de REV-ERB $\alpha$  durant le premier cycle présente au cours des expériences 1, 2 et 4 n'est pas observée dans l'expérience 3.

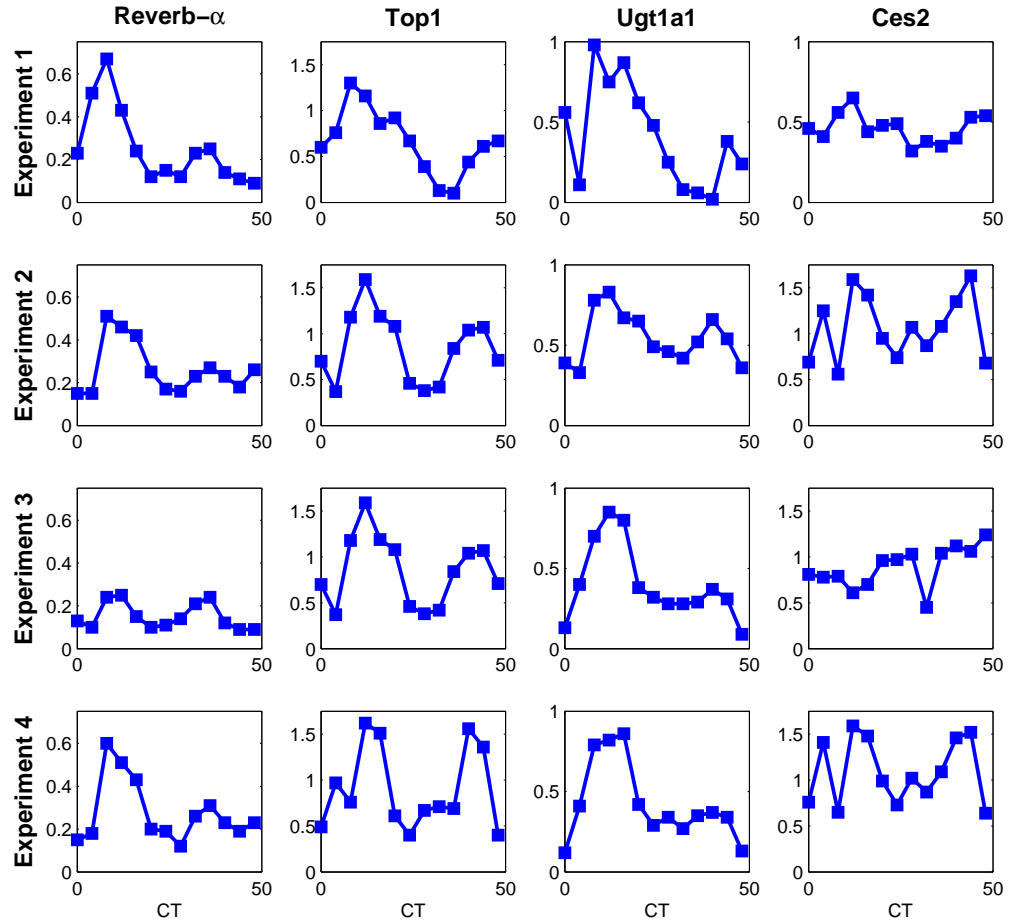


FIG. 2.6: Rythme circadien des quantités d'ARN de REV-ERB $\alpha$ , TOP1, UGT1A1 et CES2 dans quatre expériences indépendantes.

## Expression protéique et activité de la TOP1

La variation circadienne des quantités de protéines de TOP1 dans le noyau et dans le cytoplasme a été mesurée dans des cellules synchronisées, en l'absence de médicament. Les quantités de protéines nucléaires et cytoplasmiques n'ont pas présenté de variations circadiennes significatives, d'après la comparaison des données expérimentales à la formule du cosinor, par une approche de bootstrap (Figure 2.7, chapitre 5). Il est à noter que les protéines de TOP1 ont présenté une localisation principalement nucléaire dans les cellules Caco-2.

L'activité de la TOP1 a été étudiée à CT14 et CT28, dans des cellules synchronisées, en mesurant le pourcentage de protéines liées à l'ADN. 28.53% de la quantité totale de TOP1 étaient liées à l'ADN à CT14, à comparer à 27.98% à CT28. Cette faible variation circadienne est en accord avec l'absence de rythme dans l'expression protéique nucléaire (Figure 2.7).

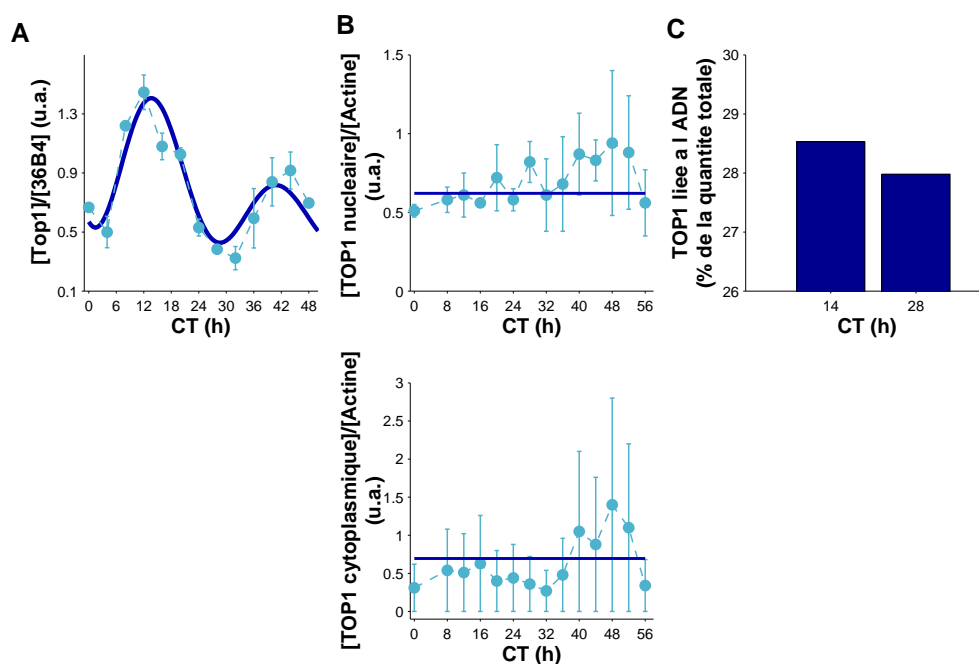


FIG. 2.7: Expression génique, protéique, et activité de la TOP1. **A** ARN messagers : données expérimentales et modèle présentés à la figure 2.5 **B** Protéines nucléaires et cytoplasmiques. Les résultats expérimentaux (bleu clair) sont la moyenne  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes. Le modèle (bleu foncé) est le résultat de l'analyse cosinor (cf. chapitre 5). **C** Activité de la TOP1, un point de donnée pour chaque CT.

## Rythme de la quantité de TOP1 liée à l'ADN, en présence de CPT11

L'activité de la TOP1 a ensuite été mesurée après une exposition de 30 min au CPT11 (50  $\mu$ M) débutant à CT14 et CT28. Le pourcentage de protéines de TOP1 liée à l'ADN était de 47% (SEM 5.2%) de sa quantité totale après une exposition à CT14, et de 35.5% (SEM 1.8%) après une exposition à CT28 (Figure 2.8). Cette différence est validée statistiquement ( $p=0.05$ ).

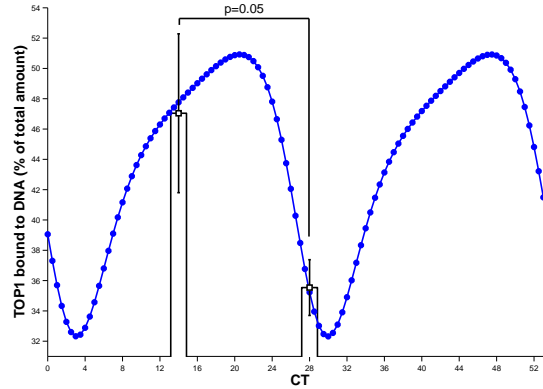


FIG. 2.8: Rythme circadien de la quantité de protéines de TOP1 liée à l'ADN en présence de CPT11, dans des cellules Caco-2 synchronisées. Les barres représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes ( $\pm$  SEM), après exposition au CPT11 à CT14 et CT28. La courbe continue représente la variation circadienne de la quantité de complexes sur l'ADN (somme des variables *DNA-TOP1*, *Compl* et *Icompl*) simulée par le modèle mathématique de la PK-PD du CPT11, calibré aux données comme décrit à la section 2.4.

## Mesure circadienne de l'apoptose

Une forte corrélation entre la formation de complexe TOP1 sur l'ADN et la mort cellulaire induite par le CPT11 est décrite dans la littérature. En effet, ces deux quantités semblent varier de façon similaire en fonction de la dose et du temps d'exposition au CPT11 ([61, 62, 63]). Nous avons voulu vérifier que cette corrélation était aussi vraie pour la rythmicité circadienne. Pour cela, nous avons mesurer le nombre de cellules apoptotiques rapporté à la viabilité cellulaire, 24 et 48 h après une exposition d'une heure au CPT11, débutant à CT14 ou CT28. L'expérience a été menée pour deux concentrations de CPT11 : 25 et 50  $\mu$ M.

Le taux d'apoptose 24 ou 48 h après l'administration du CPT11 est significativement plus élevé pour l'exposition à CT14 que pour l'exposition à CT28, pour les deux concentrations de médicament ( $p=0.008$ , Figure 2.8).

Cette différence circadienne est en accord avec les rythmes circadiens de la quantité de TOP1 lié à l'ADN durant une exposition au CPT11.

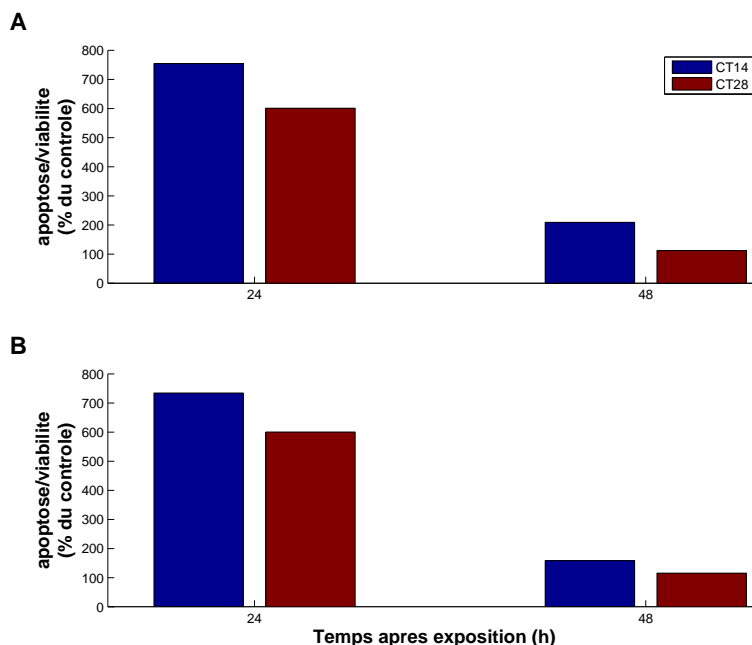


FIG. 2.9: Variation circadienne de l'apoptose après exposition au CPT11 des cellules Caco-2 synchronisées. **A** Exposition à 25  $\mu$ M, **B** Exposition à 50  $\mu$ M. Mesure de l'apoptose 24 et 48 h après une exposition d'une heure au CPT11 débutant à CT14 ou CT28. Les résultats sont la moyenne ( $\pm$  SEM) de 6 points de données provenant d'une expérience.

## 2.4 Estimation des paramètres du modèle mathématique, par comparaison aux données expérimentales

Les résultats expérimentaux sur les cellules Caco-2 ont été utilisés pour estimer les valeurs des paramètres du modèle mathématique. Cette estimation a comporté deux étapes. La première a consisté à déterminer des intervalles de valeurs réalistes pour chaque paramètre. La seconde étape a été de rechercher, dans ces intervalles, les valeurs finales des paramètres, en calibrant le modèle aux données expérimentales présentées aux figures 2.2, 2.7 C et 2.8, par une approche de bootstrap (cf. chapitre 5). Nous détaillons, tout d'abord, la recherche d'intervalles de valeurs pour chaque paramètre, puis l'estimation finale.

## Absorption du CPT11

Nous avons supposé que l'absorption du CPT11 suit une loi de diffusion passive, de paramètre  $k_{upCPT}$  (cf. chapitre 5). Une approximation de ce paramètre peut être obtenu en utilisant les résultats expérimentaux d'accumulation intracellulaire du CPT11 durant les 10 premières minutes d'exposition (Figure 2.3). Nous supposons que l'efflux est négligeable sur cette période de temps, le médicament n'ayant le temps que d'entrer dans le milieu intracellulaire, et non d'en sortir ([30, 29]). L'équation 2.1 est alors réduite au terme d'absorption et est résoluble explicitement :

$$[CPT_{out}](t) = C_{tot}e^{-k_{uptCPT}t}$$

La méthode des moindres carrées a été utilisée pour comparer ce modèle aux données de la figure 2.3 et nous a permis d'estimer la valeur suivante :  $k_{upCPT}=5.9 \text{ h}^{-1}$ . Le paramètre  $k_{upCPT}$  a donc été recherché dans l'intervalle [3 9] au cours de l'estimation de paramètres finales.

## Efflux du CPT11

L'efflux du CPT11 a été supposé actif et suit donc une cinétique de type Michaelis-Menten de paramètres  $V_{effCPT}$  et  $K_{effCPT}$ . Nous connaissons désormais une approximation du paramètre d'absorption du CPT11  $k_{upCPT}$ , ainsi que l'évolution temporelle de l'accumulation du CPT11, pour trois concentrations : 10, 40 et 115  $\mu\text{M}$  (Figures 2.2 et 2.4). Il est alors possible de déterminer un intervalle de valeurs pour les paramètres d'efflux, en utilisant l'équation 2.1.

Pour ce faire, la valeur de la dérivée de  $[CPT_{out}]$  est approché par un schéma d'Euler explicite, ce qui donne l'équation suivante :

$$\frac{[CPT_{out}](t + \Delta t) - [CPT_{out}](t)}{\Delta t} \frac{V_{out}}{V_{in}} + k_{upCPT}[CPT_{out}](t) = \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}(t)]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}(t)]} \quad (2.16)$$

Le membre de droite de l'équation 2.16 peut être vu comme une fonction de  $[CPT_{in}](t)$  à calibrer aux données. Pour chaque point de temps des données expérimentales disponibles pour les trois concentrations de CPT11, nous pouvons calculer la valeur du membre de gauche de l'équation 2.16. Nous utilisons ensuite une méthode des moindres carrés pour rechercher les valeurs de  $V_{effCPT}$  et  $K_{effCPT}$  pour lesquelles le membre de droite est le plus proche de ces valeurs calculées. L'estimation nous fournit les valeurs suivantes de paramètres :  $V_{effCPT}[ABC\_CPT]=1170 \mu\text{M.h}^{-1}$  et  $K_{effCPT}=71 \mu\text{M}$  (Figure 2.10). Une déviation de  $\pm 50\%$  à été autorisée pour l'estimation finale.



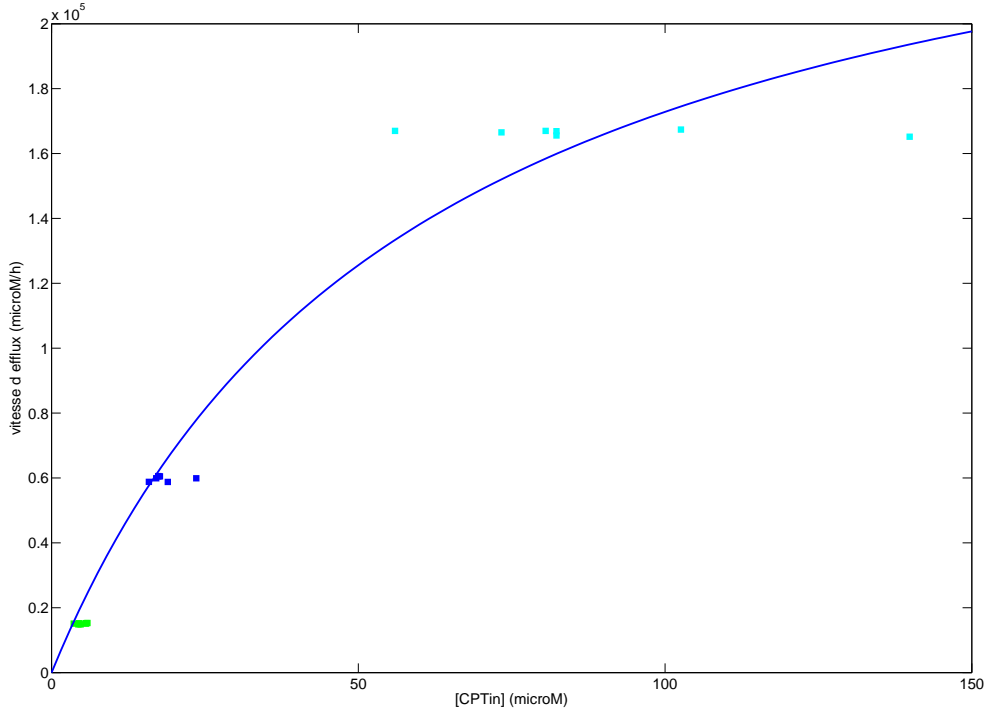


FIG. 2.10: **Vitesse d'efflux du CPT11** Les points correspondent à l'évaluation du membre de gauche de l'équation 2.16 à chaque point de temps (et donc à chaque concentration intracellulaire de CPT11), des expériences d'exposition à 10, 40 et 115  $\mu\text{M}$  de CPT11. La courbe continue est la représentation du membre de droite pour les valeurs optimales des paramètres  $V_{effCPT}$  et  $K_{effCPT}$ , déterminées par la méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5).

### Activation du CPT11 en SN38

La biotransformation du CPT11 en SN38 est catalysée par les enzymes CESs et suit une cinétique de type Michaelis-Menten de paramètres  $V_{ces}$  et  $K_{ces}$ . Nous ne disposons de données dans les cellules Caco-2 que pour une seule concentration de CPT11 (figure 2.2), ce qui est insuffisant pour déterminer la valeur des deux paramètres. Des travaux *in vitro* de la littérature rapporte une conversion du CPT11 en SN38 par des carboxylestérases humaines de foie de paramètres  $K_{ces}=53 \mu\text{M}$  et  $V_{ces}=0.714 \mu\text{M.h}^{-1}$  avec  $[\text{CES}]=2.03 \mu\text{M}$  ([21]). La mesure de la bioactivation du CPT11 dans des hépatocytes de rats fournit les valeurs  $K_{ces} = 53\mu\text{M}$  et  $V_{ces}= 1.018 \mu\text{M. h}^{-1}$  avec  $[\text{CES}]= 1.42 \mu\text{M}$  ([22]). Nous cherchons donc  $V_{ces}[\text{CES}]$  dans l'intervalle  $[0.5, 5]$  et  $K_{ces}$  dans  $[20, 150]$ .

### Absorption du SN38 et du SN38G

Nous avons supposé que l'absorption du SN38 suit une loi de diffusion passive, de paramètre  $k_{upSN}$ . Comme aucune mesure n'est, pour le moment, disponible dans notre lignée Caco-2, nous avons utilisé les données expéri-

mentales de [30] pour déterminer un ordre de grandeur du paramètre, en utilisant la même méthode que pour le paramètre d'absorption du CPT11. Nous avons trouvé  $k_{upSN}=15.3 \text{ h}^{-1}$  et avons autorisé une déviation de  $\pm 100\%$  dans l'estimation de paramètres finale.

En l'absence de données expérimentales sur l'absorption cellulaire du SN38G, nous l'avons supposé égale à celle du SN38.

## Efflux du SN38 et du SN38G

L'efflux du SN38 suit une cinétique de Michaelis-Menten de paramètres  $V_{effSN}$  et  $K_{effSN}$ . Ces paramètres ont directement été déduits de l'estimation finale. Les paramètres d'efflux du SN38G ont été supposés égaux à ceux du SN38.

## Désactivation du SN38 en SN38G

La glucuronidation du SN38 en SN38G est catalysée par les enzymes UGT1As et suit une cinétique de type Michaelis-Menten de paramètres  $V_{ugt}$  et  $K_{ugt}$ . Aucune mesure du SN38G n'a pour le moment été réalisée dans notre lignée de cellules Caco-2. En revanche, l'enzyme UGT1A1 s'exprime dans notre lignée (Figure 2.5). Nous avons donc supposé cette voie de métabolisation active. La comparaison de notre modèle aux données de la littérature par la méthode des moindres carrés nous fournit les valeurs suivantes de paramètres :  $V_{ugt}[UGT]=27 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$  et  $K_{ugt}= 2.13 \text{ } \mu\text{M}$  ([22]). Nous avons donc rechercher  $V_{ugt}[UGT]$  dans l'intervalle  $[0, 90]$  et  $K_{ugt}$  dans  $[0, 5]$ .

## Quantité totale d'ADN

Les sites de liaisons sur l'ADN dans lesquels la TOP1 peut s'insérer sont supposés apparaître toutes les  $k_{entry}$  paires de bases. Ainsi, nous définissons une unité d'ADN comme un site de liaison, ou encore comme un site de liaison et les  $k_{entry}$  paires de bases qui le séparent du prochain site. Quand le site de liaison est libre, il est sous la forme  $DNA_{free}$ , quand une molécule de TOP1 lui est associée, il devient une molécule  $Compl$ . Comme une cellule contient approximativement  $3.2.10^9$  paires de bases, la quantité de moles de sites de liaison est :  $\frac{3.2.10^9}{N_A k_{entry}}$  mol où  $N_A$  est la constante d'Avogadro. Le volume moyen d'une cellule Caco-2 étant de  $V_{cell} = 8.10^{-12} \text{ L}$ , nous en déduisons que la concentration de sites de liaison est :  $DNA_{tot} = \frac{3.2.10^9}{N_A k_{entry} V_{cell}}$  M. D'après la littérature,  $k_{entry}$  est compris entre 1 et 100 paires de bases. Nous avons donc recherché  $DNA_{tot}$  dans l'intervalle  $[5 \text{ } 500]$ .

## Formation et dégradation de la TOP1

Nous déterminons, tout d'abord, un ordre de grandeur de la concentration totale de TOP1 en utilisant les résultats expérimentaux présentés sur les figures 2.2 et 2.7. En supposant que toutes les molécules de SN38 présentes dans le milieu intracellulaire sont en complexe avec la TOP1, et sachant qu'environ 40% de la quantité totale de la TOP1 était lié à l'ADN en présence de médicament (Figure 2.8), la concentration totale de TOP1 peut être estimée à  $0.025 \mu\text{M}$ .

A l'équilibre, en l'absence de médicament, la quantité de TOP1 libre vaut  $\frac{k_{f\text{top}}}{k_{d\text{top}}}$  et a été mesurée à environ 72% de sa quantité totale (Figure 2.7 C). Par souci de simplification, nous fixons  $k_{d\text{top}}$  à 1 et cherchons donc  $k_{f\text{top}}$  dans l'intervalle  $[0 \ 0.05]$ .

## Formation et dissociation des complexes réversibles ADN/TOP1

Les complexes réversibles ADN/TOP1 se forment à la vitesse  $k_{f1}$  et se dissocie à la vitesse  $k_{d1}$ . En l'absence de médicament, lorsque les cellules sont à l'équilibre, environ 28% de la quantité totale de TOP1 est lié à l'ADN. Cet état stationnaire peut être obtenu pour les valeurs suivantes de paramètres :  $k_{f1} = 2$ ,  $k_{d1} = 300$ . Une déviation de  $\pm 50\%$  à été autorisée pour l'estimation finale.

## Formation et dissociation des complexes réversibles ADN/TOP1/SN38, et formation des dommages irréversibles

Les constantes d'association ( $k_{f2}$ ) et de dissociation ( $k_{r2}$ ) des complexes ADN/TOP1/SN38 ont été directement inférées de l'estimation finale. Il en est de même pour la vitesse de formation des dommages irréversibles à l'ADN  $k_{Irr}$ .

## Paramètres circadiens des quantités de protéines CES, UGT, ABC\_CPT, ABC\_SN et TOP1

Nous considérons que la première période des oscillations est artificiellement perturbée par le choc sérique et commençons les simulations au début de la deuxième, à partir de laquelle les oscillations des ARN et protéines semblent être régulières.

Pour les quantités de protéines de CES, UGT, ABC\_CPT et ABC\_SN, les paramètres  $M$  et  $k_d$  de l'équation 2.11 sont fixés à 1. La phase  $\phi$  du terme de formation est supposée égale à celle de l'ARN correspondant, estimée grâce aux données expérimentales (figure 2.5 et tableau 2.1). Seule l'amplitude  $A$  est donc évaluée durant l'estimation finale, sa valeur étant

recherchée dans l'intervalle  $[0,1]$ . Les quantités de protéines sont donc égales à 1, en l'absence d'entraînement circadien (i.e.  $A=0$ ).

L'équation 2.11 calibrée avec ces valeurs de paramètres résulte en un décalage d'environ 1h30 entre les rythmes d'ARN et de protéines, une durée correspondant au temps de synthèse des protéines. Cette durée semble réaliste puisque l'expression génique et protéique de la TOP1 sont distante d'au plus 4 h chez la souris ([42]).

Bien que le niveau d'ARN de la TOP1 présente des rythmes circadiens, sa quantité de protéines et son activité sont constantes dans les cellules Caco-2 (Figure 2.7). Nous n'avons donc pas supposé de rythmes circadiens pour la TOP1 (cf. équation 2.7).

### Estimation finale des paramètres par une méthode de bootstrap

Une approche de bootstrap est finalement utilisée pour estimer simultanément les valeurs de tous les paramètres (cf. chapitre 5). Celles-ci sont recherchées dans les intervalles décrits ci-dessus. Les données expérimentales des figures 2.2, 2.7 C, et 2.8 sont utilisées pour déterminer les valeurs finales (Tableau 2.2).

Pour les données de la figure 2.2, nous avons supposé que la présence de verapamil n'affectait que le paramètre  $V_{effCPT}$ , qui est noté  $V_{effCPT\_vera}$  lorsque les cellules sont préincubées avec l'inhibiteur. Pour l'estimation des paramètres, la concentration extracellulaire de CPT11 est comparée à la variable mathématique  $CPT_{out}$ , sa concentration intracellulaire à  $CPT_{in}$ . La concentration extracellulaire de SN38 est comparée à  $SN_{out}$ , sa concentration intracellulaire à la somme  $SN_{in} + Compl + Icompl$  puisque la méthode d'HPLC détecte la totalité du SN38 présent dans le milieu intracellulaire.

Les résultats expérimentaux de la figure 2.7 C concernent la quantité de TOP1 liée à l'ADN en l'absence de médicament et sont donc confrontés aux valeurs d'équilibre de TOP1 et DNATOP1 (Équations 2.12 et 2.13). La variation circadienne du pourcentage de protéines TOP1 en complexes présentée à la figure 2.8 est comparée à la variable mathématique  $TOP1$  pour la partie libre, et à la somme  $DNATOP1 + Compl + Icompl$  pour la partie liée à l'ADN.

L'ensemble des paramètres est déterminé simultanément, en utilisant les trois jeux de données décrits ci-dessus, par une approche de bootstrap (cf. chapitre 5).

Reaction	Symbol	Value
CPT11 uptake speed	$k_{upCPT}$	$3.64 \pm 0.53 \text{ h}^{-1}$
CPT11 efflux	$V_{effCPT}$	$594.35 \pm 116.64 \text{ h}^{-1}$
	$K_{effCPT}$	$57.72 \pm 17.85 \text{ } \mu\text{M}$
CPT11 efflux in presence of verapamil	$V_{effCPTvera}$	$409.3 \pm 66.09 \text{ h}^{-1}$
CPT11 activation	$V_{ces}$	$1.9 \pm 0.51 \text{ h}^{-1}$
	$K_{ces}$	$147.34 \pm 34.98 \text{ } \mu\text{M}$
SN38 uptake	$k_{upSN}$	$27.01 \pm 4.73 \text{ h}^{-1}$
SN38 efflux	$V_{effSN}$	$161.18 \pm 46.24 \text{ h}^{-1}$
	$K_{effSN}$	$1.28 \pm 0.57 \text{ } \mu\text{M}$
SN38 glucuronidation	$V_{ugt}$	$65.59 \pm 23.25 \text{ h}^{-1}$
	$K_{ugt}$	$2.69 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{M}$
DNATOP1 complex formation	$k_{f1}$	$0.75 \pm 0.21 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$
DNATOP1 complex dissociation	$k_{r1}$	$118.33 \pm 35.12 \text{ h}^{-1}$
DNA/TOP1/SN38 complex formation	$k_{f2}$	$2432.42 \pm 967.28 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$
DNA/TOP1/SN38 complex dissociation	$k_{r2}$	$2.56 \pm 0.77 \text{ h}^{-1}$
Irreversible complex formation	$k_{Irr}$	$0.0035 \pm 0.0025 \text{ h}^{-1}$
Entry sites on DNA for TOP1 binding	$k_{entry}$	$10.42 \pm 3.1 \text{ pairs of bases}$
TOP1 protein formation	$k_{ftop}$	$0.018 \pm 0.009 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$
Amplitude of CPT11 bioactivation circadian rhythm	$A_{CES}$	$0.9 \pm 0.09 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$
Amplitude of CPT11 efflux circadian rhythm	$A_{ABC\_CPT}$	$0.37 \pm 0.32 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$
Amplitude of SN38 efflux circadian rhythm	$A_{ABC\_SN}$	$0.22 \pm 0.18 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$
Amplitude of SN38 glucuronidation circadian rhythm	$A_{UGT}$	$0.45 \pm 0.31 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$

TAB. 2.2: **Paramètres du modèle de la PK-PD moléculaire du CPT11 dans les cellules Caco-2.** Moyennes  $\pm$  SD estimées par comparaison aux données expérimentales (cf. partie 2.4), en utilisant une approche de bootstrap (cf. chapitre 5).

L'amplitude circadienne estimée de CES est plus grande que celle de UGT,  $ABC\_CPT$ , et  $ABC\_SN$  (Tableau 2.2). Le modèle prédit ainsi que la bioactivation du CPT11 serait le déterminant principal des rythmes de l'activité du CPT11.

Le modèle mathématique, une fois calibré aux données expérimentales, a été utilisé pour optimiser l'exposition des cellules Caco-2 au CPT11.

## 2.5 Optimisation théorique de l'exposition circadienne des Caco-2 au CPT11

Le modèle mathématique de la PK-PD moléculaire du CPT11 ainsi calibré aux données expérimentales des cellules Caco-2 a été utilisé dans des procédures d'optimisation dont le but est de déterminer des schémas d'exposition chronomodulés optimaux pour la lignée de cellules considérée.

Dans cette partie, nous considérons les cellules Caco-2 synchronisées par un choc sérique comme les cellules saines, et les cellules non synchronisées comme les cellules cancéreuses ([71]). Ce choix est motivé par le fait que l'organisation circadienne est souvent perturbée dans les tissus tumoraux ([1]). Le modèle de la PK-PD du CPT11, avec les valeurs de paramètres décrites ci-dessus, est donc utilisé pour simuler la réponse au médicament des cellules normales. Nous modélisons le comportement des cellules tumorales par le même modèle dans lequel les amplitudes  $A$  des protéines UGT, ABC\_CPT, ABC\_SN et CES sont mises à zéro.

Les schémas d'administration considérés prennent la forme d'une exposition à une concentration extracellulaire initiale donnée de CPT11, sur une durée comprise entre 1 et 27 h, débutant à un temps circadien (CT) particulier. Nous avons choisi de tels schémas parce qu'ils sont facilement reproductibles en culture de cellules. La dose cumulée est ici définie comme la concentration extracellulaire initiale de CPT11 multipliée par la durée d'exposition. Les procédures d'optimisation thérapeutique ont consisté à optimiser selon le critère choisi les valeurs de la dose cumulée, de la durée d'exposition et du CT à laquelle elle débute.

Le CPT11 est détectable dans le sang des patients cancéreux jusqu'à environ 24 h après son administration, à des concentrations allant de 0 à 20  $\mu\text{M}$  ([1]). Nous avons donc considéré des doses cumulées comprises entre 0 et 1440  $\mu\text{M.h}$  ce qui correspond à une exposition pendant 24 h à des concentrations initiales allant de 0 à 60  $\mu\text{M}$  de CPT11.

### **Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sans contrainte de toxicité**

Nous avons, tout d'abord, uniquement considéré la population de cellules cancéreuses et avons recherché les schémas d'exposition qui maximisent les dommages à l'ADN au sein de la population. Le CT d'exposition n'a pas d'influence sur l'efficacité du médicament puisque les cellules ne sont pas synchronisées. Les seuls paramètres à optimiser sont donc la dose cumulée et la durée d'exposition.

La cytotoxicité de chaque schéma d'administration a été évaluée mathématiquement par la valeur de la variable  $I_{compl}$  en fin d'exposition, dans les cellules cancéreuses. Elle a été calculée pour des valeurs de la dose cumulée allant de 0 à 1440  $\mu$  M.h et des durées d'exposition comprises entre 1 et 27 h (Figure 2.11). Pour toutes les doses cumulées considérées, les schémas optimaux consistent en une exposition au CPT11 durant 1h50 à 7h40, cette durée augmentant avec la dose.

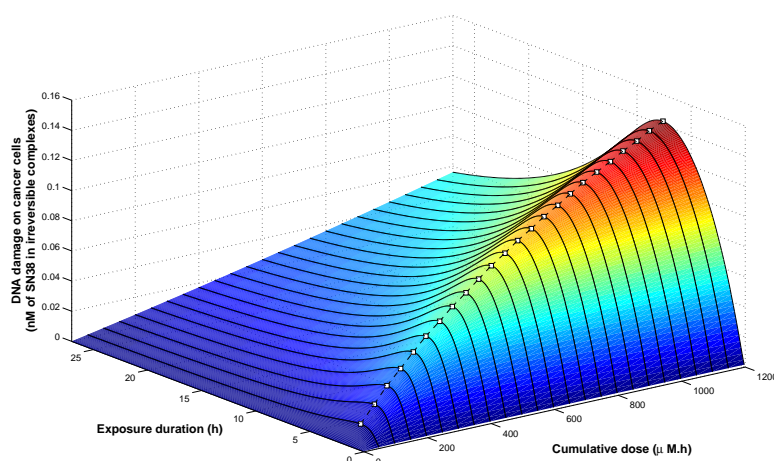


FIG. 2.11: **Optimisation théorique de l'exposition au CPT11 des cellules cancéreuses.** Efficacité sur les cellules non synchronisées, en fonction de la dose cumulée de CPT11 et de la durée d'exposition. Les points blancs représentent la durée maximisant les dommages à l'ADN, pour chaque dose.

### Minimiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules saines, sans contrainte d'efficacité

Nous avons ensuite uniquement considéré la population de cellules saines et avons recherché les schémas d'exposition qui minimisent les dommages à l'ADN au sein de la population. La cytotoxicité de chaque schéma a été évaluée par la valeur de la variable  $I_{compl}$  en fin d'exposition, dans les cellules saines. La dose cumulée de CPT11 a été arbitrairement fixée à 500  $\mu$  M.h, pour présenter un exemple, les caractéristiques mises en évidence ci-après ayant été vérifiées pour toute dose comprise entre 0 et 1440  $\mu$  M.h. La valeur de  $I_{compl}$  a été calculée numériquement pour une durée d'exposition comprise entre 1 et 27 h et un CT de début d'exposition allant de CT0 à CT54, ce qui correspond à deux périodes (Figure 2.12).

Pour toutes les durées d'exposition considérées, le schéma d'exposition le mieux toléré débute entre CT2 et CT3. Cet intervalle de temps correspond à 1 à 2 h avant le creux de l'activité des CESs dans le modèle mathématique

(Figure 2.12, 2.13 A). Le schéma le plus toxique est obtenu en administrant le CPT11 à CT21, sur une durée égale à celle qui induit la plus grande efficacité chez les cellules cancéreuses (4 h pour la dose de  $500 \mu \text{ M.h}$ ). CT21 ne correspond pas exactement au pic d'activité des CESs mais plutôt à l'équilibre optimal entre une forte valeur de CES et une faible activité d'UGT, ABC\_CPT et ABC\_SN. Il est à noter que cette durée la plus toxique, qui est aussi la plus efficace, présente la plus grande amplitude circadienne en terme de dommages à l'ADN dans les cellules saines.

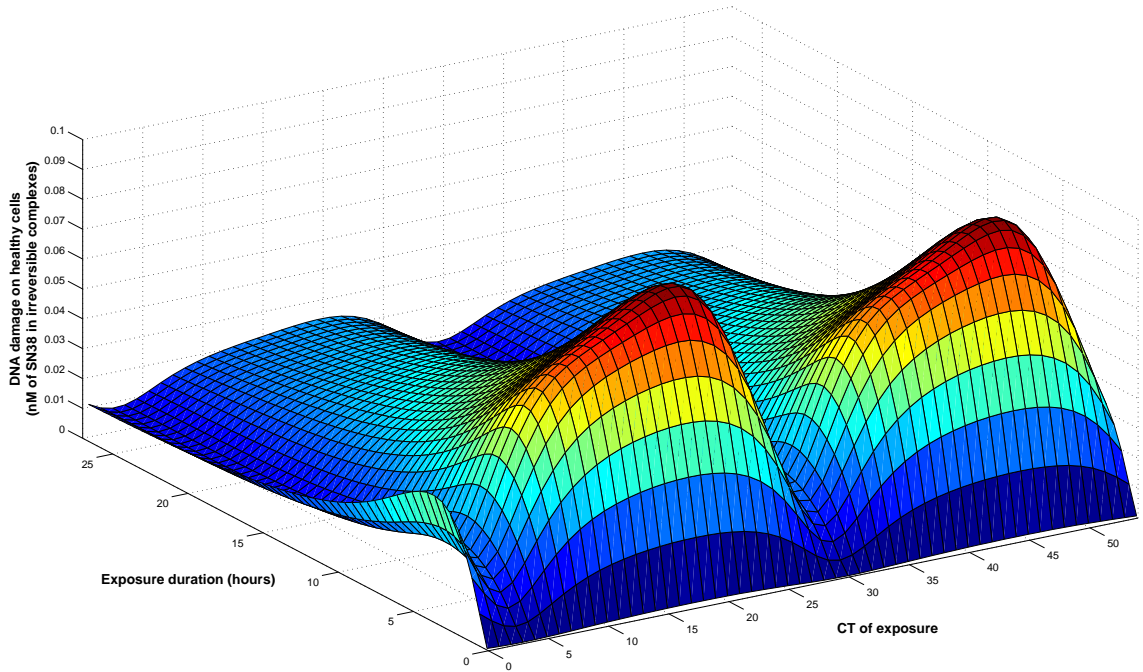


FIG. 2.12: **Optimisation théorique de l'exposition au CPT11 des cellules saines.** Toxicité du CPT11 sur les cellules saines, en fonction de la durée d'exposition et du temps circadien de début d'exposition. La dose cumulée de CPT11 est fixée à  $500 \mu \text{ M.h}$ .

### Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sous une contrainte de tolérabilité

Nous avons ensuite considéré simultanément les populations de cellules saines et cancéreuses. Nous avons recherché les schémas d'exposition maximisant les dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses, sous la contrainte que ceux dans les cellules saines ne dépassent pas un seuil de tolérabilité ([72]). D'un point de vue clinique, ce seuil représente la toxicité maximale qu'un patient peut supporter. Il peut donc varier en fonction du genre ou



des polymorphismes génétiques du patient. Dans nos simulations, les cellules saines et cancéreuses sont exposées de façon identique au médicament, reproduisant ainsi la situation *in vivo* dans laquelle les tissus sains et tumoraux sont soumis aux mêmes concentrations sanguines.

La procédure d'optimisation utilisée est décrite en détail au chapitre 5. Elle a consisté en la minimisation d'une fonction coût se présentant sous la forme d'une somme de deux termes : l'un pour l'efficacité et l'autre pour la contrainte de toxicité. Le terme correspondant à l'efficacité est égal à l'opposé de la variable *Icompl* dans les cellules cancéreuses en fin d'exposition. Le terme de contrainte vaut 0 si la contrainte de toxicité est respectée, c'est-à-dire si la variable *Icompl* dans les cellules normales en fin d'exposition est inférieure au seuil de tolérabilité fixé. Dans le cas contraire, le terme de contrainte vaut 1000. L'algorithme de minimisation cherchera donc les valeurs des paramètres qui minimisent le fonction, c'est-à-dire ceux pour lesquels le terme de contrainte est nul et la contrainte de tolérabilité est respectée. Les schémas optimaux ont été déterminés pour un seuil de toxicité compris entre 0.01 et 0.04 nM de SN38 irréversiblement lié à l'ADN (Figure 2.13 B).

Pour les valeurs de seuil de tolérabilité considérées, les doses cumulées optimales sont comprises entre 241 et 1321  $\mu$  M.h, et augmentent avec le seuil. Pour toutes les doses, les schémas optimaux durent de 3h40 à 7h10 et débutent entre CT2h10 et CT2h30, ce qui correspond à 1h30 à 1h50 avant le creux d'activité des CESs. Les expositions optimales ne sont pas centrées sur le minimum de CES mais s'étendent plutôt après, lorsque les activités d'UGT, ABC\_CPT et ABC\_SN sont plus élevées et protègent donc plus efficacement les cellules saines. La durée maximale de ces schémas optimaux est 7h10, ce qui souligne la nécessité d'expositions courtes pour exploiter optimalement les différences circadiennes entre tissus sains et tissus tumoraux. Concernant l'efficacité de ces administrations optimales, celles-ci induisent deux fois plus de dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales.

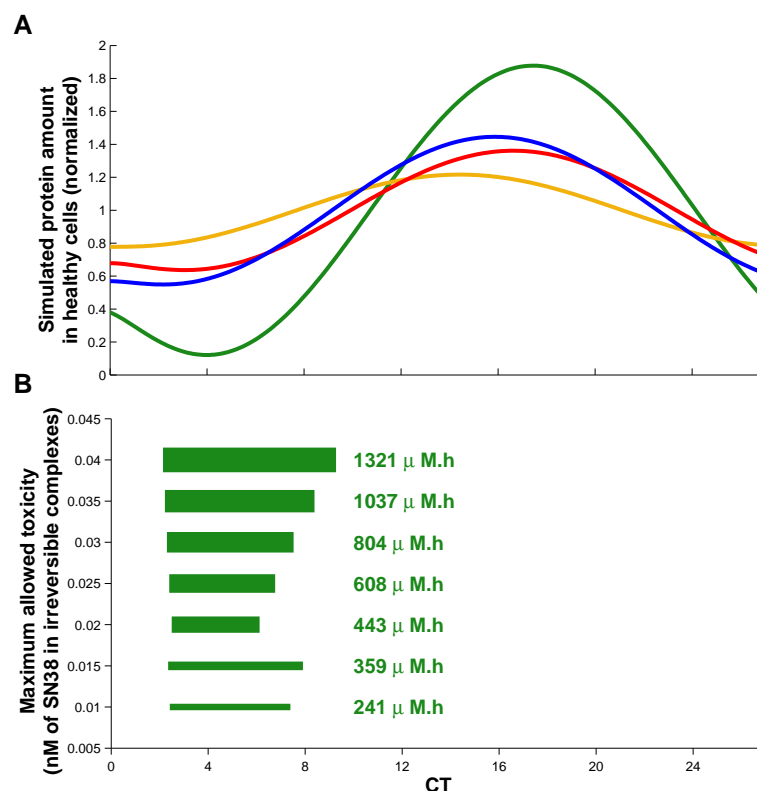


FIG. 2.13: **Optimisation théorique de l'administration chronomodulée du CPT11 dans les cellules Caco-2.** **A** : rythmes circadiens simulés des quantités de protéines de CES (vert), UGT (bleu), ABC\_CPT (rouge) et ABC\_SN (orange). **B** : schémas d'exposition optimaux, en suivant la stratégie thérapeutique de maximiser le dommage à l'ADN dans les cellules cancéreuses, sous une contrainte de toxicité maximale. Les schémas optimaux consistent en l'administration d'une dose cumulée de CPT11 écrite en vert, sur une durée comprise entre 3h40 et 7h10, commençant 1h30 à 1h50 avant le creux d'activité des CESs.

## 2.6 Discussion et perspectives

Cette étude combinée mathématique et biologique a, tout d'abord, permis la démonstration expérimentale d'une organisation circadienne dans les cellules Caco-2, ayant pour conséquence un rythme de la pharmacodynamie du CPT11. Un modèle mathématique de la PK-PD moléculaire du CPT11 a été construit et calibré aux données expérimentales des cellules Caco-2. Il a été utilisé dans une procédure théorique d'optimisation thérapeutique qui nous a permis de conclure, que l'administration optimale de toute dose de CPT11 consiste en une exposition de 3h40 à 7h10, débutant 1h30 à 1h50 avant le creux du rythme de bioactivation du CPT11 par les CESs.

Du SN38 a été détecté dans les cellules Caco-2, ce qui est en accord avec le fait que la CES2 était exprimée. Son efflux n'a pas été influencé par l'exposition au verapamil, suggérant une faible activité de cet inhibiteur sur les transporteurs du SN38. ABCG2, qui joue un rôle majeur dans la sortie active du SN38, est en effet faiblement inhibé par le verapamil ([73]). Une autre possibilité serait que l'efflux du métabolite actif n'implique pas de transporteurs actifs et se fasse de façon passive par diffusion à travers la membrane cellulaire. Cela est envisageable dans la mesure où les molécules de SN38 sont fortement lipophiles.

Le CPT11 est converti par les cytochromes P450 3A4/3A5 en APC et NPC ([20]). Ces voies moléculaires n'ont pas été prises en compte dans cette étude puisqu'elles sont décrites comme inactives dans la plupart des lignées Caco-2 ([68]). Néanmoins, le verapamil inhibe les cytochromes P450 ([74]) et la forte augmentation de la concentration intracellulaire de CPT11 en présence de l'inhibiteur pourrait aussi être expliquée par la diminution de la métabolisation du CPT11 en APC et NPC. La mesure de l'activité des cytochromes de notre lignée Caco-2 est en cours dans notre laboratoire.

Le modèle mathématique prédit que les rythmes circadiens de la bioactivation du CPT11 déterminent principalement la rythmicité de sa PD. Même si l'amplitude des rythmes d'ARN messagers de la CES2 était faible dans les cellules Caco-2, sa quantité de protéines et son activité pourraient présenter de fortes variations circadiennes. En effet, les niveaux de protéines de la CES1 dans le colon de deux lignées de souris présentent des rythmes circadiens marqués, malgré une quantité d'ARN constante ([75]). Cependant, nous avons supposé dans notre modélisation un décalage de 1h30 entre l'expression des ARN et celle des protéines, durée qui pourrait s'avérer plus longue ([76]). Les activités des UGT1As ou des transporteurs ABC pourraient alors jouer un rôle majeur dans la rythmicité de la PD du CPT11, si le rythme de leurs ARN était décaler de plus de dix heures de celui de leur

expression protéique. Ce cas de figure n'a pas été privilégié dans notre étude car les rythmes des ARN et des protéines de la TOP1 sont décalés d'au plus 4 h chez la souris ([42]).

L'étude expérimentale des rythmes circadiens d'activité de bioactivation du CPT11, de désactivation du SN38 et du transport du CPT11 et du SN38 est donc en cours dans notre laboratoire. Le modèle mathématique, une fois ajusté à ces données expérimentales déterminantes, fournira des schémas d'exposition théoriquement optimaux possiblement plus proches de la réalité expérimentale. La prochaine étape sera leur validation sur cellules Caco-2.

### Perspectives *in vitro*

Notre modèle mathématique de la PK-PD du CPT11 évalue la cytotoxicité du médicament par la quantité de complexes irréversibles ADN/TOP1/SN38. Ces complexes déclenchent des mécanismes de réparation à l'ADN ([77]). De nombreuses enzymes impliquées dans la réparation présentent des rythmes circadiens ([78]). De plus, les dommages à l'ADN induits par le CPT11 peuvent déclencher la machinerie apoptotique dont certaines protéines, telles que p53, l'enzyme pro-apoptotique BAX, ou celle anti-apoptotique BCL2, ont des variations circadiennes ([79, 80, 75]). Les voies de réparation de l'ADN activées par le CPT11 et les protéines impliquées dans l'apoptose peuvent être étudiées expérimentalement dans les cellules Caco-2 et être incluses dans une version étendue du modèle mathématique.

Dans cette étude, nous avons différencié les cellules cancéreuses des cellules saines par leur faible entraînement circadien. Cependant, le fort taux de prolifération des cellules cancéreuses constitue une autre différence importante que nous n'avons pas considérée puisque nous étudions des cellules quiescentes. Le modèle mathématique de la PK-PD du CPT11 a été couplé à un modèle de cycle cellulaire entraîné par l'horloge circadienne, afin de pouvoir simuler la réponse au médicament de cellules proliférantes ([81]). L'étape suivante serait donc l'étude expérimentale de la PK-PD du CPT11 sur des cellules Caco-2 en prolifération.

### Perspectives cliniques

Une interprétation clinique des stratégies thérapeutiques optimales obtenues pour les cellules Caco-2 présentant une période de 27 h, peut être obtenu en redimensionnant les résultats à la période de l'Homme qui est de 24 h. Cette mise à l'échelle humaine prédit que le CPT11 devrait être administré de sorte que l'exposition des cellules de l'organisme durent entre 3h30 et 6h30, et débutent de 1h30 à 1h40 avant le creux du rythme de bioactivation du CPT11 chez le patient. Lorsque le CPT11 est perfusé selon un

schéma semi-sinusoïdale d'une durée de 6 h chez les patients cancéreux, le médicament est détecté dans le sang pendant approximativement 12 h ([1]). Notre étude *in vitro* suggère donc de réduire la durée d'administration du CPT11. Cela amènera probablement à réduire la dose totale de médicament, de manière à garder une tolérabilité acceptable, et augmentera possiblement l'efficacité du traitement.

Ce chapitre présente une étude au niveau de populations de cellules qui permet d'optimiser les schémas d'exposition au CPT11. L'étape suivante consiste à optimiser les schémas d'administration du médicament à l'échelle de l'organisme entier. Trois classes de souris présentant des rythmes circadiens de toxicité au CPT11 différents ont été expérimentalement mises en évidence. Notre modèle mathématique de la PK-PD du CPT11 au niveau tissulaire a été intégré dans une modélisation corps entier à base physiologique, dont le but est d'optimiser l'administration du CPT11 pour chacune des trois classes de souris (cf. chapitre 3). Le passage de l'échelle de la souris à l'échelle humaine est ensuite possible par un redimensionnement des paramètres du modèle corps entier. Cela permettra alors la détermination de schémas d'administration optimaux pour les patients cancéreux.

## 2.7 Etude de la résistance acquise au CPT11

### 2.7.1 Motivations

Le phénomène de résistance multiple aux médicaments se produit en réaction à l'administration de chimiothérapies. Il est caractérisé par la capacité des cellules cancéreuses à être simultanément résistantes à la plupart des agents antitumoraux. Un mécanisme moléculaire pouvant être à l'origine de cette résistance consiste en l'augmentation induite par le médicament de l'expression des transporteurs ABC, qui pompent les molécules en dehors des cellules ([82]). La surexpression de ces transporteurs d'efflux empêche l'accumulation des agents anticancéreux dans le milieu intracellulaire, diminuant ainsi leur efficacité.

Le CPT11 et ses métabolites sont des substrats de plusieurs transporteurs ABC. L'exposition au CPT11 ou au SN38 peut induire une surexpression des transporteurs ABCB1 et ABCG2 dans des lignées de cellules cancéreuses et dans les tissus tumoraux chez le patient ([83, 84, 85]). Nous proposons ici une étude théorique de cette résistance acquise à l'irinotecan. Elle a pour but la détermination de combinaisons de médicaments optimales en cas de multirésistance.

Pour tenter de résoudre ce problème d'optimisation thérapeutique, nous avons construit un modèle mathématique de la PK-PD de l'irinotecan qui prend en compte l'induction des transporteurs par le médicament. Le modèle présenté à la section 2.2 a été complété par un modèle de surexpression des pompes d'efflux ABC. Les rythmes circadiens ne sont pas considérés dans cette partie, où nous étudions le phénomène de multirésistance dans des cellules non synchronisées.

Ensuite, nous avons mis en oeuvre des procédures d'optimisation afin de déterminer les schémas d'administration optimaux qui contourneraient la résistance des cellules cancéreuses. Les agents thérapeutiques considérés sont l'irinotecan, les inhibiteurs de transporteurs ABC, et les inhibiteurs de facteurs nucléaires dont l'activation est responsable de la surexpression des pompes d'efflux.

Nous avons tout d'abord rechercher les schémas d'exposition qui maximisent les dommages à l'ADN induits au sein d'une population de cellules cancéreuses, capable de surexprimer ses transporteurs d'efflux en réaction à l'irinotecan. Ensuite, nous avons considéré une population de cellules saines, identiques aux cellules cancéreuses, à l'exception qu'elles ne sont pas dotées de la capacité d'augmenter l'expression de leur transporteurs. Les schémas optimaux sont alors définis comme ceux qui maximisent le dommage à l'ADN

des cellules cancéreuses, sous la contrainte que celui des cellules saines reste inférieur à un seuil de tolérabilité.

### 2.7.2 Ajout d'un modèle d'induction des transporteurs ABC par le CPT11

Nous proposons ici une modélisation du phénomène de multirésistance, qui est ajouté au modèle mathématique de la PK-PD du CPT11 présenté à la section 2.2.

Un mécanisme moléculaire possible menant à l'induction des transporteurs ABC consiste en l'activation, par les dommages à l'ADN dus au CPT11, de facteurs nucléaires capables de promouvoir l'expression des transporteurs ABC (Figure 2.14). En effet, les cassures double brin résultant de l'exposition au CPT11 entraînent l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ([86, 87, 88]). En outre, NF- $\kappa$ B activé augmente l'expression de ABCB1 ([89, 90]). De façon similaire, les stress chimiques activent le facteur NRF-2 qui est capable de promouvoir l'expression de ABCG2, ABCC1 et ABCC2 ([91, 92, 93, 94]). De plus, les données biologiques de la littérature montrent que le CPT11 induit une activation rapide et transitoire du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, dont l'intensité sature rapidement lorsque la dose de médicament est augmentée ([87, 88]).

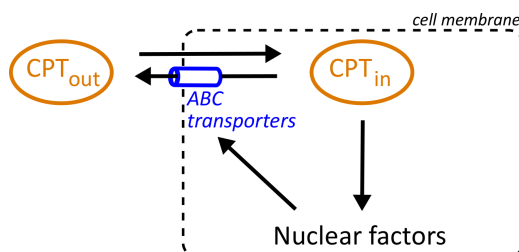


FIG. 2.14: **Mécanisme d'induction des transporteurs d'efflux par le CPT11**  
Le CPT11 dans le milieu extracellulaire ( $CPT_{out}$ ) entre passivement dans le cytoplasme ( $CPT_{in}$ ). Il est ensuite expulsé hors des cellules par des pompes d'efflux appelées transporteurs ABC.  $CPT_{in}$  induit des dommages à l'ADN responsable de l'activation de facteurs nucléaires qui promeuvent l'expression des transporteurs ABC. Cette augmentation de l'efflux du médicament a pour conséquence une diminution de sa concentration intracellulaire et donc de son efficacité.

Nous proposons donc la modélisation suivante pour la quantité d'ARN messagers et de protéines de  $ABC\_CPT$  et  $ABC\_SN$ , transporteurs responsables de l'efflux du CPT11 et du SN38 respectivement :

$$\frac{d[ABC\_X_{RNA}]}{dt} = k_{fRNA} + k_{ind} \frac{[Icompl]^n}{th_{ind}^n + [Icompl]^n} - k_{dRNA}[ABC\_X_{RNA}] \quad (2.17)$$

$$\frac{d[ABC\_X_{Prot}]}{dt} = k_{fABC}[ABC\_X_{RNA}] - k_{dABC}[ABC\_X_{Prot}] \quad (2.18)$$

où  $ABC\_X$  représente soit  $ABC\_CPT$ , soit  $ABC\_SN$ .

Les ARN messagers  $ABC\_X_{RNA}$  sont créés par transcription ( $k_{fRNA}$ ) et dégradés par la cellule ( $k_{dABC}$ ). Les protéines  $ABC\_X_{Prot}$  proviennent de la traduction de  $ABC\_X_{RNA}$  ( $k_{fABC}$ ) et sont également dégradées ( $k_{dABC}$ ). Les molécules d'ARN ne sont pas consommées par le processus de traduction car une molécule peut produire plusieurs protéines.

L'activation de facteurs nucléaires par le CPT11 est modélisée phénoménologiquement dans l'équation 2.17 par la fonction de Hill :

$$k_{ind} \frac{[Icompl]^n}{th_{ind}^n + [Icompl]^n}$$

Cette fonction présente une augmentation brutale de 0 à  $k_{ind}$  lorsque  $Icompl$ , le dommage à l'ADN induit par le CPT11, dépasse le seuil d'induction des transporteurs  $th_{ind}$ .

Ce choix de modélisation résulte en une surexpression des ARN et protéines des transporteurs ABC qui persiste après l'exposition au médicament. Le retour à des niveaux normaux de transporteurs a été observé expérimentalement dans des lignées de cellules cancéreuses seulement après deux mois ([84]). Cette réversibilité de l'induction est donc négligée puisque notre but est de concevoir des schémas d'exposition optimaux *à court terme*.

Dans un souci de simplification, nous supposons que  $ABC\_X_{RNA}$  et  $ABC\_X_{Prot}$  sont égaux à 1  $\mu M$  à l'équilibre, en l'absence de médicament. Nous imposons ainsi  $k_{fRNA}=1 \mu M$ ,  $k_{dRNA}=1 h^{-1}$  et  $k_{fABC} = k_{dABC}$ . À l'instant initial, les cellules n'ont pas encore été exposées au CPT11 et les quantités d'ARN et de protéines des transporteurs sont donc égaux à 1. Toutes les autres variables du modèle sont nulles, sauf la concentration extracellulaire de CPT11 qui est fixée à la concentration d'exposition choisie.

La valeur des autres paramètres a été estimée en comparant le modèle aux données expérimentales de la littérature dans lesquelles une augmentation de la quantité d'ARN de ABCB1 d'un facteur 6, et de sa quantité de protéine d'un facteur 2 ont été observées après exposition au SN38 pendant 96 h de cellules cancéreuses en culture ([83]). Dans notre modèle, nous avons supposé



que cette cinétique avait lieu pour une exposition à  $80 \mu\text{M}$  de CPT11. Nous obtenons les valeurs de paramètres suivantes :  $n=20$ ,  $k_{fABC}=k_{dABC}=0.1 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{ind}=5 \mu\text{M.h}^{-1}$  et  $th_{ind}=0.13 \mu\text{M}$ .

### 2.7.3 Stratégies thérapeutiques théoriquement optimales en cas de multirésistance

#### Combinaisons de médicaments considérées

Le but de cette partie est d'optimiser la thérapeutique de l'irinotecan en cas de multirésistance. Les stratégies cliniques existantes consistent principalement en l'administration combinée d'agents anticancéreux et d'inhibiteurs de transporteurs ABC ([82]). Le modèle mathématique met en évidence une autre possibilité qui consisterait à inhiber les facteurs nucléaires. Plusieurs inhibiteurs de NF- $\kappa$ B font actuellement l'objet d'études cliniques ([95]). Leur administration en combinaison avec le CPT11 augmente l'efficacité du médicament antitumoral dans des lignées de cellules cancéreuses ([96, 97]). Cependant, NF- $\kappa$ B présente également une activité anti-apoptotique, dont l'inhibition pourrait expliquer, à elle seule, l'augmentation de la mort cellulaire. Nous considérons donc trois combinaisons de médicaments : CPT11 administré seul, combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires, ou combiné à des inhibiteurs de transporteurs ABC.

Les schémas d'administration du CPT11 considérés consistent en l'exposition constante à une concentration allant de 0 à  $3000 \mu\text{M}$ , sur une durée comprise entre 1 et 168 h. Cet intervalle de doses de CPT11 a été choisi parce qu'il résulte en une concentration extracellulaire de SN38 entre 0 et  $0.15 \mu\text{M}$  en l'absence d'induction des transporteurs, ce qui est en accord avec les valeurs physiologiques de concentration sanguine de SN38 mesurée chez le patient ([1]). Pour chacune des combinaisons de médicaments considérées, la procédure d'optimisation a consisté à rechercher la concentration de CPT11 et la durée d'exposition optimales.

Nous avons supposé que l'exposition aux inhibiteurs de facteurs nucléaires et aux transporteurs ABC avaient commencé suffisamment longtemps avant l'administration du CPT11 de sorte que le système soit à l'équilibre au moment de celle-ci. Les inhibiteurs de facteurs nucléaires ont été modélisés en fixant  $k_{ind}$  à zéro pour ABC\_CPT et ABC\_SN, ce qui correspond à une inhibition totale. Les inhibiteurs de transporteurs  $I_{ABC}$  ont été représentés comme des inhibiteurs compétitifs qui séquestrent les transporteurs ABC en formant des complexes binaires irréversibles :

$$\frac{[ABC\_X_{Prot}]}{dt} = k_{fABC}ABC\_X_{RNA} - k_{dABC}[ABC\_X_{Prot}] - k_{inhib}[I\_ABC][ABC_{Prot}] \quad (2.19)$$

$$\frac{[I\_ABC]}{dt} = -k_{inhib}[I\_ABC][ABC\_X_{Prot}] \quad (2.20)$$

Les concentrations des inhibiteurs ont été choisies suffisamment élevées pour inhiber totalement l'activité des transporteurs en l'absence d'induction par le CPT11, de sorte que  $ABC\_CPT$  et  $ABC\_SN$  soient égaux à zéro à l'instant initial en présence d'inhibiteurs de transporteurs. La concentration des inhibiteurs au temps initial a été arbitrairement fixée à  $200 \mu M$  et la valeur de  $k_{inhib}$  à 1, de sorte que l'inhibition des transporteurs induits soit rapide et complète.

### Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses

Nous avons tout d'abord considéré une unique population de cellules cancéreuses, dotées de la capacité d'induire leurs transporteurs en réponse à l'exposition au CPT11. Nous avons recherché les schémas d'exposition qui maximisent les dommages à l'ADN dans cette population, sans contrainte de tolérabilité pour le moment. La procédure d'optimisation a consisté à minimiser l'opposé de la variable  $I_{compl}$ , en utilisant l'algorithme évolutionniste CMAES (cf. chapitre 5).

Lorsque le CPT11 est administré seul, le schéma optimal consiste à exposer les cellules à la plus haute concentration de  $3000 \mu M$  durant la durée maximale de 168 h, malgré le déclenchement de la résistance (Figure 2.15). Ce résultat numérique suggère que les cellules cancéreuses devraient être exposées à la plus haute dose tolérable, de manière à ce que la plus grande quantité de dommages à l'ADN soit créée avant que l'activité des transporteurs ne soit accrue. Ce schéma d'exposition est aussi le schéma optimal dans le cas où le CPT11 est combiné aux inhibiteurs de facteurs nucléaires ou de transporteurs ABC. Il est à noter que, lorsque le CPT11 est administré seul, la concentration extracellulaire de SN38 est largement supérieure à celle calculée dans le cas des combinaisons avec les inhibiteurs (Figure 2.15). En effet, l'induction de l'efflux du SN38 diminue son accumulation dans le milieu intracellulaire, et donc sa désactivation en SN38G par les enzymes UGT1As.

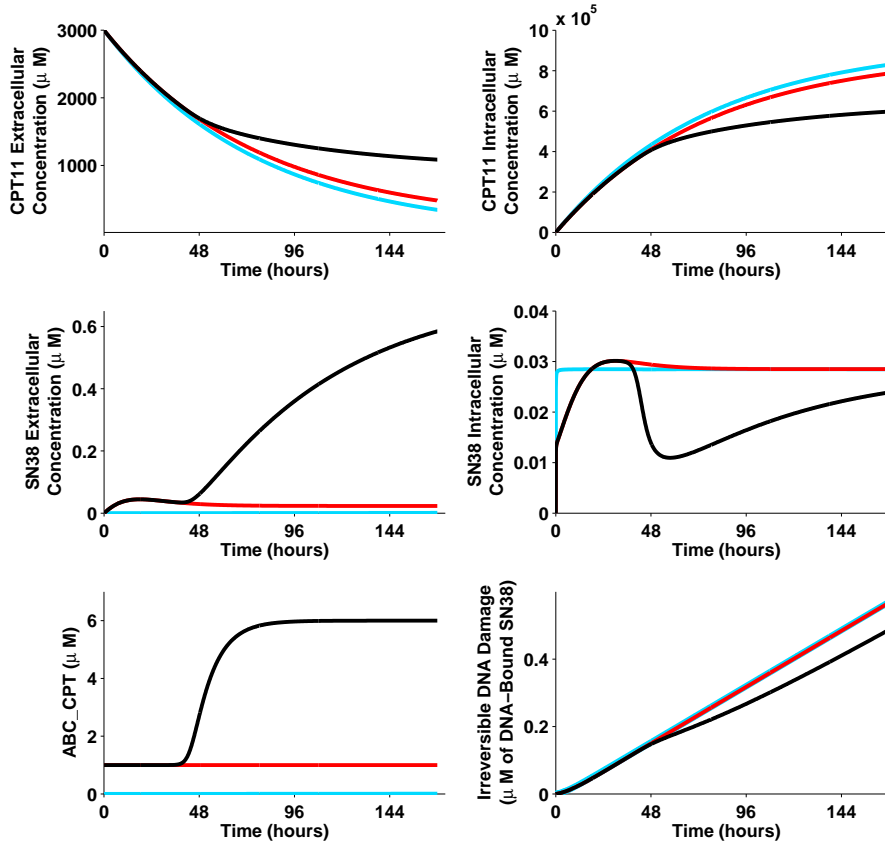


FIG. 2.15: Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sans contrainte de tolérabilité. Évolution temporelle des concentrations extra et intracellulaires de CPT11 et SN38, de la quantité de protéines des transporteurs ABC\_CPT, et des dommages à l'ADN *Icompl* durant 168 h d'exposition à 3000  $\mu\text{M}$  de CPT11 administré seul (noir), combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires (rouge), ou à des inhibiteurs de transporteurs ABC (bleu). Ce schéma d'exposition au CPT11 est celui qui maximise le dommage à l'ADN pour les trois combinaisons de médicaments. Lorsque le CPT11 est administré seul, les cellules cancéreuses augmentent leur expression de transporteurs ABC, ce qui provoque une diminution des concentrations intracellulaires de CPT11 et de SN38, et donc des dommages à l'ADN induits. La co-administration d'inhibiteurs de facteurs nucléaires ou de transporteurs ABC empêche la surexpression des pompes d'efflux, augmentant ainsi les cassures simple ou double brin sur l'ADN.

### Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sous une contrainte de tolérabilité

Nous avons ensuite considéré une population de cellules saines, identiques en tout point aux cellules cancéreuses précédemment décrites, à l'exception qu'elle ne sont pas dotées du mécanisme de résistance leur permettant de surexprimer leurs transporteurs d'efflux. Les schémas d'exposition optimaux sont désormais définis comme ceux qui maximisent les dommages à l'ADN

dans la population de cellules cancéreuses, sous la contrainte que ceux dans la population de cellules saines n'excèdent pas un seuil de tolérabilité ([72]). Les schémas optimaux d'exposition ont été déterminés pour un seuil de tolérabilité compris entre 0.1 et 0.5  $\mu$  M de SN38 irréversiblement lié à l'ADN.

La procédure d'optimisation a consisté à minimiser, par l'algorithme CMAES, une fonction coût qui prend la forme d'une somme de deux termes (cf. chapitre 5). Le premier est égal à l'opposé des dommages à l'ADN *Icompl* dans les cellules cancéreuses, et prend typiquement ses valeurs entre 0 et 0.5  $\mu$  M de SN38 irréversiblement lié à l'ADN. Le second terme représente la contrainte de toxicité. Il est égal à 0 lorsque *Icompl* dans les cellules saines est en-dessous du seuil de tolérabilité et devient égal à 1000 dans le cas contraire. Les procédures d'optimisation ont donné les résultats suivants pour les trois combinaisons de médicaments.

Lorsque le CPT11 est administré seul, les schémas optimaux d'exposition consistent en l'administration de concentrations de 370 à 2700  $\mu$ M, sur une durée optimale allant de 36 à 152 h, augmentant linéairement avec le seuil de toxicité autorisée (Figure 2.16). Lorsque le seuil de toxicité est inférieur au seuil d'induction des transporteurs (0.13  $\mu$  M de SN38 irréversiblement lié à l'ADN), les dommages à l'ADN dans les populations de cellules cancéreuses et saines sont égaux, puisque le mécanisme de résistance n'est pas déclenché. Au contraire, lorsque le seuil d'induction est dépassé, les schémas optimaux d'exposition induisent 12% plus de dommages à l'ADN dans les cellules saines que dans les cellules cancéreuses qui ont déclenché leur mécanisme de résistance.

La combinaison du CPT11 avec des inhibiteurs de facteurs nucléaires permet une diminution de 50% des doses optimales de CPT11, par rapport à son administration seul, les durées optimales restant inchangées (Figure 2.16). De plus, l'inhibition des facteurs nucléaires annule totalement l'avantage des cellules cancéreuses puisque le dommage à l'ADN induit dans celles-ci est égal à celui induit dans les cellules saines.

L'utilisation d'inhibiteurs de transporteurs ABC combinés au CPT11 permet de diminuer encore plus les doses optimales de CPT11 qui sont alors comprises entre 150 et 290  $\mu$ M (Figure 2.16). Les durées optimales sont légèrement diminuées par rapport aux autres combinaisons de médicaments et augmentent linéairement avec le seuil de tolérabilité autorisé, de 32 à 148 h. Cette stratégie thérapeutique permet également une annihilation totale de la résistance puisque les dommages dans les cellules saines et dans les cellules cancéreuses sont égaux. Nous concluons donc que cette combinaison

de médicaments est la stratégie théoriquement optimale en cas de multirésistance puisque, d'une part, elle contourne la résistance des cellules tumorales, et d'autre part, elle utilise les plus petites concentrations de CPT11, ce qui diminuera les risques de toxicités dans la perspective d'une administration chez le patient cancéreux.

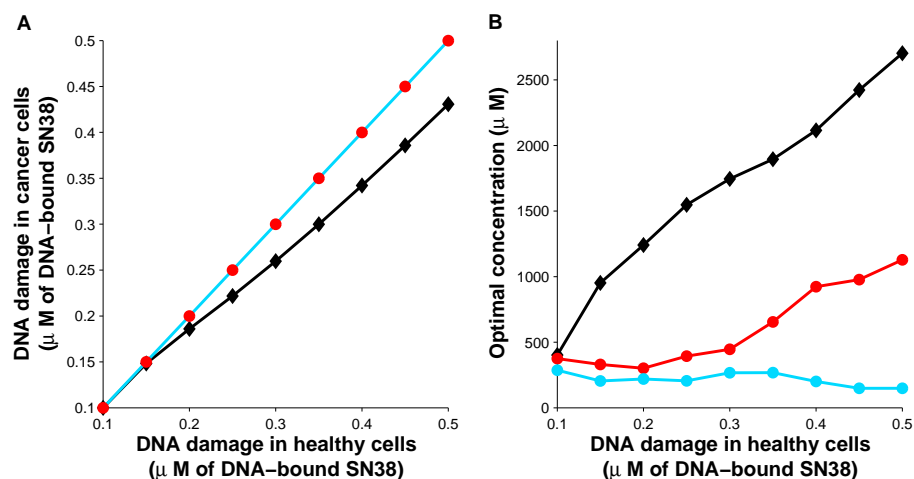


FIG. 2.16: Maximiser les dommages à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sous une contrainte de tolérabilité. Schémas d'exposition optimaux pour trois stratégies thérapeutiques : exposition au CPT11 administré seul (noir), combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires (rouge), ou combiné à des inhibiteurs de transporteurs ABC (bleu). **A.** Dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses, en fonction du seuil de tolérabilité dans les cellules saines : les combinaisons du CPT11 avec des inhibiteurs de facteurs nucléaires ou de transporteurs ABC annihilent la résistance au CPT11 des cellules cancéreuses. **B.** Concentrations optimales de CPT11, en fonction du seuil de tolérabilité : les concentrations optimales diminuent d'approximativement 50 % lorsque le CPT11 est combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires, par rapport à son administration seul. Combiner le CPT11 avec des inhibiteurs de transporteurs ABC permet une encore plus importante diminution des concentrations optimales.

### 2.7.4 Discussion

A notre connaissance, deux autres études publiées proposent une modélisation de la surexpression des transporteurs due aux médicaments. Un modèle de la PK-PD de la doxorubicine inclut l'induction des transporteurs, qui est supposée proportionnelle à la concentration intracellulaire du médicament ([98]). Ce choix de modélisation ne tient pas compte du seuil sur les concentrations de médicaments, expérimentalement observé, en-dessous duquel la résistance n'est pas déclenchée. De plus, ce modèle permet à la quantité de transporteurs ABC de devenir infiniment grande, en cas, par exemple, de grandes concentrations de médicaments. Notre modélisation évite que le niveau de transporteurs augmente vers des valeurs non physiologiques puisque le terme d'induction sature rapidement à sa valeur maximale  $k_{ind}$  lorsque le dommage à l'ADN  $I_{compl}$  augmente (cf. équation 2.17).

D'autres travaux présentent un modèle de la PK-PD du 5-fluorouracil et incluent l'induction des transporteurs d'efflux ([1]). Dans ce modèle, les facteurs nucléaires restent activés tant que la concentration intracellulaire du médicament dépasse un seuil d'induction. Cependant, l'activation de NF- $\kappa$ B en présence de CPT11 ne dure que quelques heures et disparaît bien avant la fin de l'exposition au médicament ([87]). De plus, dans ce modèle, le seuil d'induction est appliqué de façon phénoménologique aux concentrations intracellulaires, et non aux dommages à l'ADN. Ce choix implique que le schéma optimal d'exposition, qui tuera un nombre maximal de cellules cancéreuses, consiste à administrer une concentration inférieure au seuil d'induction, pendant une longue période, ce qui n'active pas le processus de résistance. Au contraire, notre modèle conclut que le mécanisme de résistance sera déclenché de toute façon, et que la plus haute dose tolérable doit être administrée à la première exposition, pour tuer un maximum de cellules cancéreuses lorsque leurs transporteurs ne sont pas encore surexprimés.

Notre étude conclut que la combinaison de CPT11 et d'inhibiteurs de transporteurs ABC est la stratégie thérapeutique optimale puisqu'elle permet d'annihiler totalement la multirésistance et nécessite les concentrations les plus faibles de CPT11. Cependant, la toxicité des inhibiteurs de facteurs nucléaires et de transporteurs ABC eux-mêmes n'a pas été prise en compte. En effet, plusieurs inhibiteurs de transporteurs ABC provoquent des toxicités pour la moelle osseuse, et neurologiques, qui restent cependant limitées dans la plupart des cas ([82]).

### 2.7.5 Conclusion

Cette partie présente un modèle pour l'induction des transporteurs d'efflux par le CPT11. Ce travail de modélisation suggère que le schéma d'exposition

qui maximise le dommage à l'ADN dans les cellules cancéreuses consiste en l'administration de la plus haute dose, dès la première exposition, de manière à produire le plus de cassures simple et double brins lorsque les transporteurs ne sont pas encore surexprimés. Dans le cas où une contrainte de tolérabilité est considérée, nous concluons que la stratégie thérapeutique optimale consiste à administrer le CPT11 combiné à des inhibiteurs de transporteurs ABC, puisque cette combinaison permet d'annihiler la résistance des cellules cancéreuses et implique l'utilisation des doses les plus faibles de CPT11.

### **2.7.6 Résultats expérimentaux sur culture de cellules Caco-2**

Nous avons étudié expérimentalement l'induction des transporteurs ABC par le CPT11 dans des cellules Caco-2 non synchronisées. L'objectif des expériences présentées ci-après est de déterminer si le CPT11 induit l'expression de ses principaux transporteurs d'efflux, à savoir ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2.

#### **Méthodes**

Quatre jours après l'obtention de la confluence, les cellules non synchronisées ont été exposées, ou non, à 120  $\mu$ M de CPT11 pendant 96 heures. Les prélèvements de cellules ont été effectués après 0, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72 et 96 h d'exposition.

#### **Résultats**

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2 dans les cellules témoins et dans les cellules exposées au CPT11 (Figure 2.17). Les niveaux d'expression des transporteurs ABCB1 et ABCC2, dans les cellules traitées ou non, augmentent jusqu'à environ 12 h puis diminuent jusqu'à 36 h pour augmenter plus modérément jusqu'à 96 h. ABCC1 présente ce comportement uniquement dans le groupe témoin. Le niveau d'expression du transporteur ABCG2 varie peu dans le temps, et semble similaire dans les cellules contrôles ou exposées au CPT11.

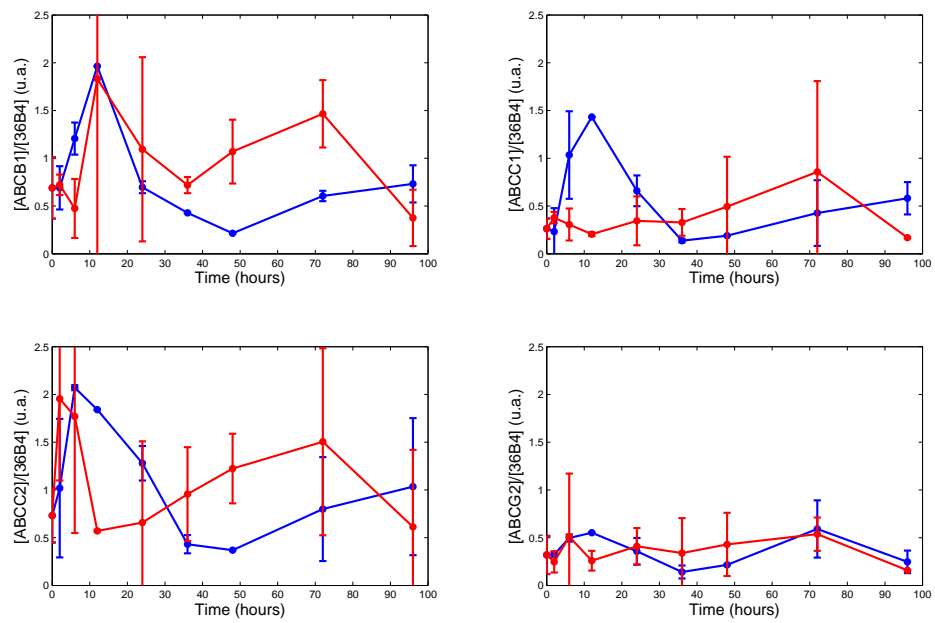


FIG. 2.17: Quantité d'ARN messagers des principaux transporteurs d'efflux du CPT11, en présence (rouge) et absence (bleu) du médicament. Les résultats présentés sont la moyenne ( $\pm$  SEM) de deux points de données provenant d'une même expérience.



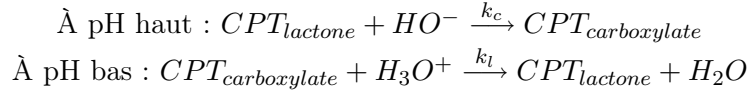
## 2.8 Etude de l'équilibre des formes lactone et carboxylate du CPT11

Le CPT11 existe sous deux formes selon le pH : lactone ou carboxylate. Un pH acide favorise la formation de la forme lactone, alors qu'un pH alcalin favorise celle de la forme carboxylate ([26]).

### Le modèle mathématique

Un modèle mathématique à base d'équations différentielles ordinaires a été construit pour étudier l'équilibre entre les formes lactone et carboxylate du CPT11 en fonction du pH de la solution. Nous supposons la température égale à  $37^\circ C$ . Nous considérons que les réactions se produisent dans un système contenant une solution tampon, de sorte que le pH reste constant. C'est notamment le cas du milieu extracellulaire en culture de cellules.

Deux réactions chimiques inverses se produisent :



La vitesse de ces réactions dépendent clairement de la concentration en ions  $[H_3O^+]$  et  $[HO^-]$ , et donc du pH.

Nous notons  $CPT_l$  et  $CPT_c$  les concentrations des formes lactone et carboxylate du CPT11 respectivement. Elles sont exprimées en  $\mu M$ . Nous considérons un système fermé dans lequel la quantité totale de CPT11 est conservée :  $CPT_c + CPT_l = CPT_{tot}$ .

Nous supposons que les réactions considérées suivent la loi d'action de masse et utilisons la loi de conservation de la quantité de CPT11 pour obtenir l'équation suivante pour  $CPT_l$  :

$$\frac{dCPT_l}{dt} = -(k_l[H_3O^+] + k_c[HO^-])CPT_l + k_l[H_3O^+]CPT_{tot}$$

Par définition, les concentrations des ions  $[H_3O^+]$  et  $[HO^-]$  dépendent du pH comme suit :  $[H_3O^+] = 10^{-pH}$  et  $[HO^-] = 10^{pH-14}$ .

Nous introduisons ces expressions dans l'équation 2.21 :

$$\frac{dCPT_l}{dt} = -(k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14})CPT_l + k_l 10^{-pH}CPT_{tot}$$

Le pH peut être considéré comme constant puisque nous sommes en présence d'une solution tampon. L'équation ci-dessus peut alors être résolue analytiquement :

$$CPT_l(t) = (CPT_l(0) - \frac{B}{A})e^{-At} + \frac{B}{A} \quad (2.21)$$

avec  $A = k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14}$  et  $B = k_l 10^{-pH} CPT_{tot}$

A l'équilibre,  $CPT_l$  admet la valeur suivante :

$$CPT_l^* = \frac{B}{A} = \frac{k_l 10^{-pH}}{k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14}} CPT_{tot}$$

## Estimation des paramètres et validation du modèle

Nous avons utilisé les données expérimentales présentées dans les tableaux I et II de [26] pour estimer  $k_c$  et  $k_l$  par une méthode des moindres carrés, utilisant l'algorithme CMAES pour la tâche de minimisation (cf. chapitre 5). Les valeurs de paramètres obtenues sont :  $k_l = 19300 \text{ h}^{-1}$  et  $k_c = 8.54 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$  (Figure 2.18, 1 et 2). Nous avons ensuite validé notre modèle en le comparant aux résultats expérimentaux de la figure 6 dans [26] qui présente le pourcentage de forme lactone à l'équilibre en fonction du pH (Figure 2.18, 3).

## Équilibres dans les conditions expérimentales de culture des cellules Caco-2

La solution mère de CPT11 qui a été utilisé pour les expériences sur les Caco-2 a un pH de 4.4. Or, la culture des cellules s'est faite dans un milieu extracellulaire de pH 7.8. Il a donc fallu ajouter la solution mère au milieu de culture avant l'exposition aux cellules de sorte que l'équilibre des formes lactone et carboxylate soit atteint au moment de celle-ci. Nous avons utilisé le modèle mathématique présenté ci-dessus pour estimer la durée nécessaire à l'obtention de l'équilibre.

En termes numériques, dire que la concentration de la forme lactone de CPT11  $CPT_l$  est à l'équilibre au temps  $t^*$  se traduit par :  $CPT_l(t^*) - CPT_l^* \leq eps$ , où  $eps$  peut typiquement être fixé à  $10^{-3}$ .

À pH 4.4, toutes les molécules de CPT11 sont sous forme lactone ([26]) :  $[CPT_l](0) = [CPT_{total}]$ . En utilisant l'équation 2.21, nous obtenons la formule suivante pour  $t^*$  :

$$t^* \geq \frac{1}{A} (\ln(CPT_l(0) - \frac{B}{A}) - \ln(eps)).$$

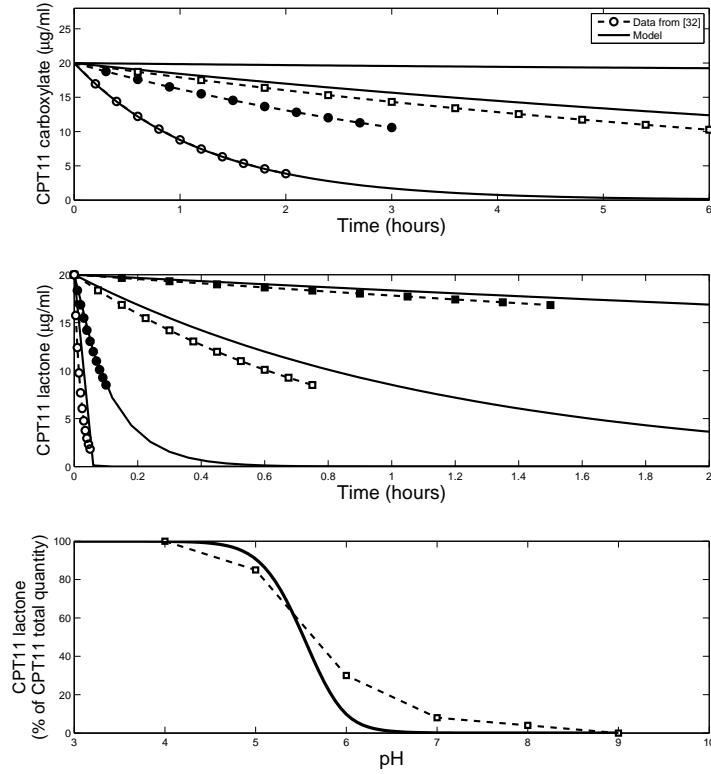


FIG. 2.18: **Estimation des paramètres et validation du modèle mathématique de l'équilibre des formes lactone et carboxylate du CPT11** **1** : évolution temporelle de la transformation de la forme carboxylate en forme lactone à pH 4 (○), 5 (●) et 6 (□). **2** : évolution temporelle de la transformation de la forme lactone en forme carboxylate à pH 6 (■), 7 (□), 8 (●) et 9 (○). **3** : Rapport de la forme lactone sur la quantité totale de CPT11 à l'équilibre, en fonction du pH. Les données expérimentales proviennent de [26].

Pour une concentration de CPT11 égale à  $115 \mu\text{M}$ , qui est la plus grande considérée dans nos expériences, nous obtenons :  $t^* \geq 2.9 \text{ h}$ . Nous concluons donc que la solution mère de CPT11 doit être ajoutée au milieu extracellulaire au moins 3 h avant l'exposition des cellules, pour que l'équilibre lactone/carboxylate soit atteint au moment de celle-ci.



## Chapitre 3

# Vers l'optimisation de l'administration chronomodulée du CPT11 chez la souris

### 3.1 Motivations

Les rythmes circadiens de la toxicité à l'irinotecan ont été étudiés dans six groupes de souris à savoir les trois lignées, C57BL/6, B6D2F1 et B6CBAF1, mâles et femelles. L'étude expérimentale de la survie, de la perte de poids, et des toxicité colique et hématologique en réponse à l'administration du médicament à plusieurs heures circadiennes a permis la détermination de trois classes de chronotoxicité. La classe 1, les souris de la lignée B6D2F1 femelles, présentent la pire tolérabilité au CPT11 après une administration à ZT3, et la meilleure pour une administration à ZT15. La classe 2, les souris B6D2F1 mâles, montrent une pire heure d'administration à ZT23 et une meilleure à ZT11. Enfin, la classe 3, les B6CBAF1 femelles présentent la pire tolérabilité pour une injection à ZT7, et la meilleure pour ZT15 ([101]).

Nous proposons ici une approche pluridisciplinaire mathématique et expérimentale dont le but est la détermination de schémas d'administration chronomodulés optimaux pour chaque classe de chronotoxicité. Notre étude permettra également l'investigation de biomarqueurs moléculaires des trois classes, par la mise en évidence des rythmes circadiens de protéines jouant un rôle prépondérant dans la réponse circadienne au médicament.

L'approche de modélisation que nous avons entreprise consiste en la conception d'un modèle PK-PD "corps entier" à base physiologique, qui est basée

sur une étude au niveau tissulaire, réalisée préalablement *in vitro* ([102, 57, 59]). Le modèle mathématique mis au point pour une population de cellules en culture, présenté au chapitre 2, a été adapté pour la conception du modèle "corps entier" de la PK-PD de l'irinotecan. Les paramètres du modèle doivent ensuite être déterminés pour chaque classe de chronotoxicité à partir des données expérimentales. La comparaison des trois ensembles de paramètres pourrait permettre la détermination de biomarqueurs moléculaires caractérisant chaque classe. Enfin, le modèle ainsi calibré peut ensuite être utilisé dans des procédures d'optimisation thérapeutique permettant de concevoir des schémas d'administration chronomodulés optimaux pour chaque classe.

Nous présentons ici le modèle mathématique, puis l'estimation de paramètres à partir de deux ensembles de résultats expérimentaux : la PK sanguine et tissulaire du CPT11 et du SN38 après injection aux pire et meilleure heures de tolérabilité, et les profils circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11. Un ensemble de paramètres a été déterminé pour la classe 2, les souris B6D2F1 mâles, la même étude étant en cours pour les deux autres classes.

### **3.2 Le modèle mathématique "corps entier" à base physiologique de la PK-PD du CPT11**

Le modèle mathématique dit corps entier est constitué de compartiments correspondant aux différents organes modélisés. Sont représentés : le foie, prépondérant pour la métabolisation du médicament ; les deux cibles principales de toxicité de l'irinotecan, à savoir, l'intestin et la moëlle osseuse ; la tumeur, dans le but de prendre en compte l'efficacité du traitement ; le sang ; et un dernier compartiment modélisant tous les autres tissus non éliminants (muscle, peau, etc), appelé NET pour Non-Eliminating Tissues (Figure 3.1).

Le CPT11 et ses métabolites circulent entre les compartiments par voie sanguine ou biliaire. Le foie, la moëlle osseuse, la tumeur et le compartiment NET sont reliés en entrée et en sortie avec le compartiment sanguin. L'intestin est modélisé sous la forme de deux ensembles à savoir les cellules de la muqueuse colique et iléale, et la lumière intestinale. Une circulation bidirectionnelle est supposée entre ces deux compartiments. Les cellules intestinales effluent le médicament directement vers le foie, ce qui représente la circulation sanguine à travers la veine porte ([58]). Les voies biliaires de la circulation entéro-hépatique sont modélisées par une circulation du médicament et de ses métabolites du foie vers la lumière intestinale ([103]). Enfin, la clairance rénale du médicament a lieu dans le compartiment sanguin, tan-

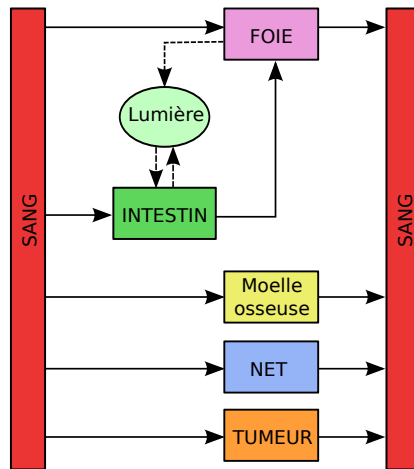


FIG. 3.1: Modèle mathématique "corps entier" de la PK-PD du CPT11.

dis que la clairance intestinale a lieu dans le compartiment de la lumière intestinale.

Chaque compartiment contient une adaptation du modèle mathématique de la PK-PD tissulaire de l'irinotecan présenté au chapitre 2. Nous décrivons ici en détail cette modélisation dans chaque organe.

### 3.2.1 Modélisation de la PK "corps entier" du CPT11

L'absorption du CPT11 et de ses métabolites, du sang vers les organes, est considérée comme passive pour tous les compartiments (cf. chapitre 2). L'efflux du médicament depuis le foie, la moëlle osseuse, le compartiment NET et la tumeur vers le sang est supposé actif et assuré par des transporteurs ABC. La glucuronidation du SN38 en SN38G est supposée inactive dans le compartiment sanguin et dans le compartiment NET. L'activité des CES pour la bioactivation du CPT11 est supposée nulle dans le compartiment NET.

Un terme de dégradation est ajouté dans le compartiment sanguin pour représenter la clairance rénale du CPT11, du SN38 et du SN38G ([103]). Le compartiment de la lumière intestinale présente un terme de clairance uniquement pour le CPT11 et le SN38, le SN38G étant principalement éliminé par les reins ([104]). Les vitesses de dégradation sont supposées proportionnelles à la concentration du médicament et de ses métabolites.

Les échanges bidirectionnels entre les cellules de la muqueuse et de la lumière intestinale impliquent des transporteurs ABC différents pour chaque

sens ([106, 107]). Les cellules coliques reçoivent en entrée le sang artériel et excrètent activement le médicament vers la veine porte, ici modélisée par un transport direct entre les compartiments du colon et du foie. La circulation entéro-hépatique est représentée par un transport actif des cellules du foie vers la bile puis la lumière intestinale. La réaction d'activation du SN38G en SN38 est modélisée, dans la lumière intestinale où la  $\beta$  – *glucuronidase* bactérienne est présente, par une loi d'action de masse. Les équations différentielles du modèle sont présentées au tableau 3.1 et 3.2.



FOIE	
$\frac{d[CPT_{foie}]}{dt} = C_{sang\_foie} - C_{foie\_sang} + C_{int\_foie} - \frac{V_{lum}}{V_{foie}}C_{foie\_bile} - C_{CES\_foie} \quad (3.1)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SN_{foie}]}{dt} &= S_{sang\_foie} - S_{foie\_sang} + S_{int\_foie} - \frac{V_{lum}}{V_{foie}}S_{foie\_bile} + C_{CES\_foie} \\ &- S_{UGT\_foie} + S_{RC\_foie} - S_{C\_foie} \end{aligned} \quad (3.2)$	
$\frac{d[SNG_{foie}]}{dt} = G_{sang\_foie} - G_{foie\_sang} + G_{int\_foie} - \frac{V_{lum}}{V_{foie}}G_{foie\_bile} + S_{UGT\_foie} \quad (3.3)$	
INTESTIN	
$\frac{d[CPT_{int}]}{dt} = C_{sang\_int} - \frac{V_{foie}}{V_{int}}C_{int\_foie} + C_{lum\_int} - C_{int\_lum} - C_{CES\_int} \quad (3.4)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SN_{int}]}{dt} &= S_{sang\_int} - \frac{V_{foie}}{V_{int}}S_{int\_foie} + S_{lum\_int} - S_{int\_lum} + C_{CES\_int} \\ &- S_{UGT\_int} + S_{RC\_int} - S_{C\_int} \end{aligned} \quad (3.5)$	
$\frac{d[SNG_{int}]}{dt} = G_{sang\_int} - \frac{V_{foie}}{V_{int}}G_{int\_foie} + G_{lum\_int} - G_{int\_lum} + S_{UGT\_foie} \quad (3.6)$	
LUMIÈRE INTESTINALE	
$\frac{d[CPT_{lum}]}{dt} = \frac{V_{int}}{V_{lum}}(C_{int\_lum} - C_{lum\_int}) + C_{foie\_bile} - C_{clair\_int} \quad (3.7)$	
$\frac{d[SN_{lum}]}{dt} = \frac{V_{int}}{V_{lum}}(S_{int\_lum} - S_{lum\_int}) + S_{foie\_bile} - S_{clair\_int} + G_{beta} \quad (3.8)$	
$\frac{d[SNG_{lum}]}{dt} = \frac{V_{int}}{V_{lum}}(G_{int\_lum} - G_{lum\_int}) + G_{foie\_bile} - G_{beta} \quad (3.9)$	
MOELLE OSSEUSE	
$\frac{d[CPT_{moel}]}{dt} = C_{sang\_moel} - C_{moel\_sang} - C_{CES\_moel} \quad (3.10)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SN_{moel}]}{dt} &= S_{sang\_moel} - S_{moel\_sang} + C_{CES\_moel} - S_{UGT\_moel} \\ &+ S_{RC\_moel} - S_{C\_moel} \end{aligned} \quad (3.11)$	
$\frac{d[SNG_{moel}]}{dt} = G_{sang\_moel} - G_{moel\_sang} + S_{UGT\_foie} \quad (3.12)$	

NET	
$\frac{d[CPT_{NET}]}{dt} = C_{sang\_NET} - C_{NET\_sang} \quad (3.13)$	
$\frac{d[SN_{NET}]}{dt} = S_{sang\_NET} - S_{NET\_sang} + S_{RC\_NET} - S_{C\_NET} \quad (3.14)$	
$\frac{d[SNG_{NET}]}{dt} = G_{sang\_NET} - G_{NET\_sang} \quad (3.15)$	
TUMEUR	
$\frac{d[CPT_{tumeur}]}{dt} = C_{sang\_tumeur} - C_{tumeur\_sang} - C_{CES\_tumeur} \quad (3.16)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SN_{tumeur}]}{dt} &= S_{sang\_tumeur} - S_{tumeur\_sang} + C_{CES\_tumeur} - S_{UGT\_tumeur} \\ &+ S_{RC\_tumeur} - S_{C\_tumeur} \end{aligned} \quad (3.17)$	
$\frac{d[SNG_{tumeur}]}{dt} = G_{sang\_tumeur} - G_{tumeur\_sang} + S_{UGT\_tumeur} \quad (3.18)$	
SANG	
$\begin{aligned} \frac{d[CPT_{sang}]}{dt} &= \frac{V_{foie}}{V_{sang}}(C_{foie\_sang} - C_{sang\_foie}) - \frac{V_{int}}{V_{sang}}C_{sang\_int} \\ &+ \frac{V_{moel}}{V_{sang}}(C_{moel\_sang} - C_{sang\_moel}) + \frac{V_{NET}}{V_{sang}}(C_{NET\_sang} - C_{sang\_NET}) \\ &+ \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}}(C_{tumeur\_sang} - C_{sang\_tumeur}) - C_{CES\_sang} - C_{clair\_ren} \end{aligned} \quad (3.19)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SN_{sang}]}{dt} &= \frac{V_{foie}}{V_{sang}}(S_{foie\_sang} - S_{sang\_foie}) - \frac{V_{int}}{V_{sang}}S_{sang\_int} \\ &+ \frac{V_{moel}}{V_{sang}}(S_{moel\_sang} - S_{sang\_moel}) + \frac{V_{NET}}{V_{sang}}(S_{NET\_sang} - S_{sang\_NET}) \\ &+ \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}}(S_{tumeur\_sang} - S_{sang\_tumeur}) + C_{CES\_sang} - S_{clair\_ren} \end{aligned} \quad (3.20)$	
$\begin{aligned} \frac{d[SNG_{sang}]}{dt} &= \frac{V_{foie}}{V_{sang}}(G_{foie\_sang} - G_{sang\_foie}) - \frac{V_{int}}{V_{sang}}G_{sang\_int} \\ &+ \frac{V_{moel}}{V_{sang}}(G_{moel\_sang} - G_{sang\_moel}) + \frac{V_{NET}}{V_{sang}}(G_{NET\_sang} - G_{sang\_NET}) \\ &+ \frac{V_{tumeur}}{V_{sang}}(G_{tumeur\_sang} - G_{sang\_tumeur}) - G_{clair\_ren} \end{aligned} \quad (3.21)$	

TAB. 3.1: **Équations du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11.** *int* signifie intestin, *lum* signifie lumière intestinale, *moel* signifie mœlle osseuse. Les flux sont décrits au tableau 3.2.

Absorption cellulaire (*organe* signifie foie, intestin, mœlle osseuse, tumeur ou NET)

$$C_{sang\_organe} = k_{upCPT\_organe}[CPT_{sang}] \quad (3.22)$$

$$S_{sang\_organe} = k_{upSN\_organe}[SN_{sang}] \quad (3.23)$$

$$G_{sang\_organe} = k_{upSN\_organe}[SNG_{sang}] \quad (3.24)$$

Transport actif (*organe* signifie foie, mœlle osseuse, tumeur ou NET)

$$C_{organe\_sang} = \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{organe}]}{K_{effCPT} + [CPT_{organe}]} \quad (3.25)$$

$$S_{organe\_sang} = \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{organe}]}{K_{effSN} + [SN_{organe}]} \quad (3.26)$$

$$G_{organe\_sang} = \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SNG_{organe}]}{K_{effSN} + [SNG_{organe}]} \quad (3.27)$$

$$C_{int\_lum} = \frac{V_{int\_lumCPT}[ABC\_CPT\_int\_lum][CPT_{int}]}{K_{int\_lumCPT} + [CPT_{int}]} \quad (3.28)$$

$$S_{int\_lum} = \frac{V_{int\_lumSN}[ABC\_SN\_int\_lum][SN_{int}]}{K_{int\_lumSN} + [SN_{int}]} \quad (3.29)$$

$$G_{int\_lum} = \frac{V_{int\_lumSN}[ABC\_SN\_int\_lum][SNG_{int}]}{K_{int\_lumSN} + [SNG_{int}]} \quad (3.30)$$

$$C_{lum\_int} = \frac{V_{lum\_intCPT}[ABC\_CPT\_lum\_int][CPT_{lum}]}{K_{lum\_intCPT} + [CPT_{lum}]} \quad (3.31)$$

$$S_{lum\_int} = \frac{V_{lum\_intSN}[ABC\_SN\_lum\_int][SN_{lum}]}{K_{lum\_intSN} + [SN_{lum}]} \quad (3.32)$$

$$G_{lum\_int} = \frac{V_{lum\_intSN}[ABC\_SN\_lum\_int][SNG_{lum}]}{K_{lum\_intSN} + [SNG_{lum}]} \quad (3.33)$$

Bioactivation de CPT11 en SN38 ( <i>organe</i> signifie sang, foie, intestin, mœlle osseuse, ou tumeur)	
$C_{CES\_organe} = \frac{V_{CES\_organe}[CES][CPT_{organe}]}{K_{CES} + [CPT_{organe}]}$	(3.34)
Glucuronidation de SN38 en SN38G ( <i>organe</i> signifie foie, intestin, mœlle osseuse, ou tumeur)	
$S_{UGT\_organe} = \frac{V_{UGT\_organe}[UGT][SN_{organe}]}{K_{UGT} + [SN_{organe}]}$	(3.35)
Circulation entéro-hépatique	
$C_{foie\_int} = \frac{V_{bileCPT}[ABC\_CPT\_bile][CPT_{foie}]}{K_{bileCPT} + [CPT_{foie}]}$	(3.36)
$S_{foie\_int} = \frac{V_{bileSN}[ABC\_SN\_bile][SN_{organe}]}{K_{bileSN} + [SN_{foie}]}$	(3.37)
$G_{foie\_int} = \frac{V_{bileSN}[ABC\_SN\_bile][SNG_{organe}]}{K_{bileSN} + [SNG_{foie}]}$	(3.38)
$\beta$ -glucuronidase	
$G_{beta} = V_{beta}[SNG_{lum}]K_{beta} + [SNG_{lum}]$	(3.39)
Clairances rénale et intestinale	
$C_{clair\_ren} = k_{renCPT}[CPT_{sang}]$	(3.40)
$S_{clair\_ren} = k_{renSN}[SN_{sang}]$	(3.41)
$G_{clair\_ren} = k_{renSNG}[SNG_{sang}]$	(3.42)
$C_{clair\_int} = k_{intCPT}[CPT_{lum}]$	(3.43)
$S_{clair\_int} = k_{intSN}[SN_{lum}]$	(3.44)

PD ( <i>organe</i> signifie foie, intestin, mœlle osseuse, ou tumeur)		
$S_{C\_organe}$	$= k_{f2}[DNATOP1_{organe}][SN_{organe}]$	(3.45)
$S_{RC\_organe}$	$= k_{r2}[Compl_{organe}]$	(3.46)

TAB. 3.2: **Flux des équations du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11** . Les équations sont présentées au tableau 3.1, les valeurs de paramètres au tableau 3.4

### 3.2.2 Modélisation de la PD "corps entier" du CPT11

La tumeur, l'intestin et la mœlle osseuse étant des tissus hautement proliférants, l'influence du cycle cellulaire sur la PD du CPT11 a été ajoutée au modèle présenté au chapitre 2, qui représentait des cellules quiescentes. Le taux de conversion des complexes réversibles ADN/TOP1/irinotecan en dommages à l'ADN irréversibles dépend en effet de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule. En phase de synthèse, les fourches de réplication qui parcourent l'ADN sont plus nombreuses. Elles créent plus de collisions avec les complexes réversibles et donc d'avantage de cassures simple ou double brin. Ce mécanisme moléculaire expliquerait pourquoi le CPT11 est spécifiquement toxique pour les cellules en phase S ([16]).

La cycline A ([CycA]) est utilisée dans le modèle mathématique comme un marqueur de la phase S ([110]). Le paramètre de conversion des complexes réversibles en dommages irréversibles est supposé proportionnel à la concentration de cycline A. Les équations de la PD du CPT11 sont donc adaptées du modèle mathématique à l'échelle tissulaire comme suit :

$$\frac{d[TOP1]}{dt} = k_{ftop} - k_{dtop}[TOP1] - k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] + k_{r1}[DNATOP1] + k_{r2}[Compl] \quad (3.47)$$

$$\frac{d[DNATOP1]}{dt} = k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] - k_{f2}[DNATOP1][SN] - k_{r1}[DNATOP1] \quad (3.48)$$

$$\frac{d[Compl]}{dt} = k_{f2}[DNATOP1][SN] - k_{r2}[Compl] - k_{Irr}[CycA][Compl] \quad (3.49)$$

$$\frac{d[Icompl]}{dt} = k_{Irr}[CycA][Compl] \quad (3.50)$$

La PD du CPT11 a été modélisée dans le compartiment tumoral, pour simuler l'efficacité du médicament, et dans les compartiments de l'intestin et de la mœlle osseuse, pour représenter les toxicités du traitement. Le paramètre  $k_{Irr}$  a été fixé à zéro dans le compartiment du foie, et dans le compartiment NET, dans la mesure où aucune toxicité, autre qu'intestinale et hématologique, n'a été observée expérimentalement après administration de CPT11

([101]). Le compartiment sanguin ne présente pas de modélisation de la PD du CPT11 ce qui suppose que la toxicité envers les cellules sanguines n'a lieu que dans la moëlle osseuse, où elles prolifèrent. Les paramètres de la pharmacodynamie  $k_{f1}, k_{r1}, k_{f2}, k_{r2}, k_{Irr}$  ont été supposés identiques dans tous les compartiments où ils apparaissent (Tableau 3.4).

### 3.2.3 Modélisation des concentrations de protéines de la pharmacologie du CPT11

Nous avons modélisé les rythmes circadiens des protéines CES, UGT, Cyc A, TOP1 et des transporteurs d'efflux du CPT11, SN38 et SN38G dans chaque compartiment où ces variables apparaissent par l'équation 2.11 (cf. chapitre 2). Nous avons supposé une période de 24 h pour toutes les variations circadiennes. Pour le cas particulier de la Top1, les termes de réactions présentés à l'équation 3.47 sont ajoutés.

### 3.2.4 État initial

À l'instant initial, le médicament est administré par voie intraveineuse. Concernant les variables représentant le médicament, seule  $CPT_{sang}$  est non nulle et fixée à  $860 \mu M$ , ce qui correspond à la dose de 50 mg/kg pour une souris B6D2F1 mâle pesant en moyenne 26 g. Les variables de la PD sont supposées à leur valeur d'équilibre (cf. chapitre 2). Les valeurs initiales des protéines présentant une variation circadienne sont fixées à celles qu'elles prennent au ZT d'injection.

## 3.3 Estimation des paramètres pour la classe 2

Un ensemble de paramètres peut être estimé pour chaque classe de souris, en ajustant le modèle aux résultats expérimentaux. Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus pour la classe 2, les souris B6D2F1 mâles, la même étude étant en cours pour les deux autres classes de chronotoxicité. Deux sortes de données expérimentales ont été utilisées pour déterminer les valeurs des paramètres : d'une part, les concentrations sanguines et tissulaires (foie, colon, moëlle osseuse, tumeur) du CPT11 et du SN38, après injection de CPT11 aux pire et meilleure heures circadiennes de tolérabilité ; et d'autre part, les profils circadiens des quantités de protéines de *ces1*, *ugt1a1* et *top1* dans le foie ; *ces1*, *ugt1a1*, *top1* et *cycline A2* dans le colon ; et *abcc2* dans l'iléon.

Les estimations de paramètres ont été réalisées par la méthode des moindres carrés, dans laquelle la tâche de minimisation de la fonction coût a été effectuée par l'algorithme CMAES (cf. chapitre 5). Les valeurs initiales des

paramètres ont été fixées à celles déterminées pour les cellules Caco-2 (Tableau 2.2, chapitre 2).

### **Estimation des paramètres circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11**

Pour l'étude expérimentale des variations circadiennes des protéines d'intérêt, les souris ont été synchronisées par une alternance de 12 h de lumière, et 12 h d'obscurité (LD 12 :12, cf. chapitre 1). Les animaux sont sacrifiés aux heures circadiennes indiquées et les tissus sont prélevés. Les rythmes circadiens des protéines sont ensuite mesurés par immunohistochimie. Sont mesurés : *ces1*, *ugt1a1* et *top1* dans le foie ; *ces1*, *ugt1a1*, *top1* et *cyclin A2* dans le colon ; et *abcc2* dans l'iléon ([101]).

L'équation 2.11 est calibrée aux données expérimentales, qui ont été normalisées en les divisant par leur valeur moyenne (Figure 3.2).  $M$  et  $k_d$  sont fixés à 1 de sorte que la valeur moyenne des quantités simulées de protéines soit égale à 1. L'amplitude  $A$  est recherchée entre 0 et 1, et la phase  $\phi$ , entre 0 et 24 h.

Pour déterminer la valeur initiale de la quantité de protéines nécessaire à la simulation de l'équation 2.11, la recherche de paramètres optimaux est effectuée une première fois, avec une condition initiale fixée à 1. Ensuite, la valeur au temps  $t = 24$  h de la courbe optimale ainsi obtenue est utilisée comme valeur initiale. La recherche des paramètres  $A$  et  $\phi$  est alors relancée avec la nouvelle condition initiale pour déterminer les valeurs finales (Tableau 3.3). Il est à noter que la condition initiale n'a que très peu d'influence sur l'amplitude et la phase estimées, puisqu'elle ne fait varier que leur deuxième décimale.

Les valeurs présentées au tableau 3.3 sont utilisées pour fixer les amplitudes  $A$  et phases  $\phi$  de CES, UGT et TOP1 dans les compartiments du foie et de l'intestin. Les rythmes de la TOP1 et de la CycA sont fixés à ceux du colon dans la moëlle osseuse, et sont considérés constants dans le compartiment tumoral. Par souci de simplification, nous ne supposons aucun rythme circadien dans le compartiment NET et le sang.

Dans la mesure où peu de données biologiques sont disponibles sur la rythmicité des transporteurs, nous avons supposé plusieurs hypothèses simplificatrices. Tout d'abord, les transporteurs d'efflux du foie vers l'intestin et vers le sang sont supposés présenter les mêmes variations circadiennes. Ensuite, une rythmicité circadienne est considérée pour le transport de l'intestin vers



Protéines	A (u.a.h <sup>-1</sup> )	Phase (h)
FOIE		
ces1	0.25	18.85
top1	0.19	2.0
ugt1a1	0.48	22.09
COLON		
ces1	0.13	23.93
top1	0.09	9.1
ugt1a1	0.2	7.7
cycline A2	0.14	0.63
ILEON		
abcc2	1	7.25

TAB. 3.3: **Valeurs des paramètres circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11, pour la classe 2.** Valeurs estimées par la méthode des moindres carrées. u.a. = unités arbitraires

la lumière intestinale, mais pas pour le transport dans l'autre sens. Les transporteurs de l'intestin vers le foie sont supposés avoir les mêmes rythmes que ceux vers la lumière intestinale. L'ensemble des rythmes de transporteurs d'efflux est directement inféré des données de PK, comme décrit dans la partie suivante (Tableau 3.5).

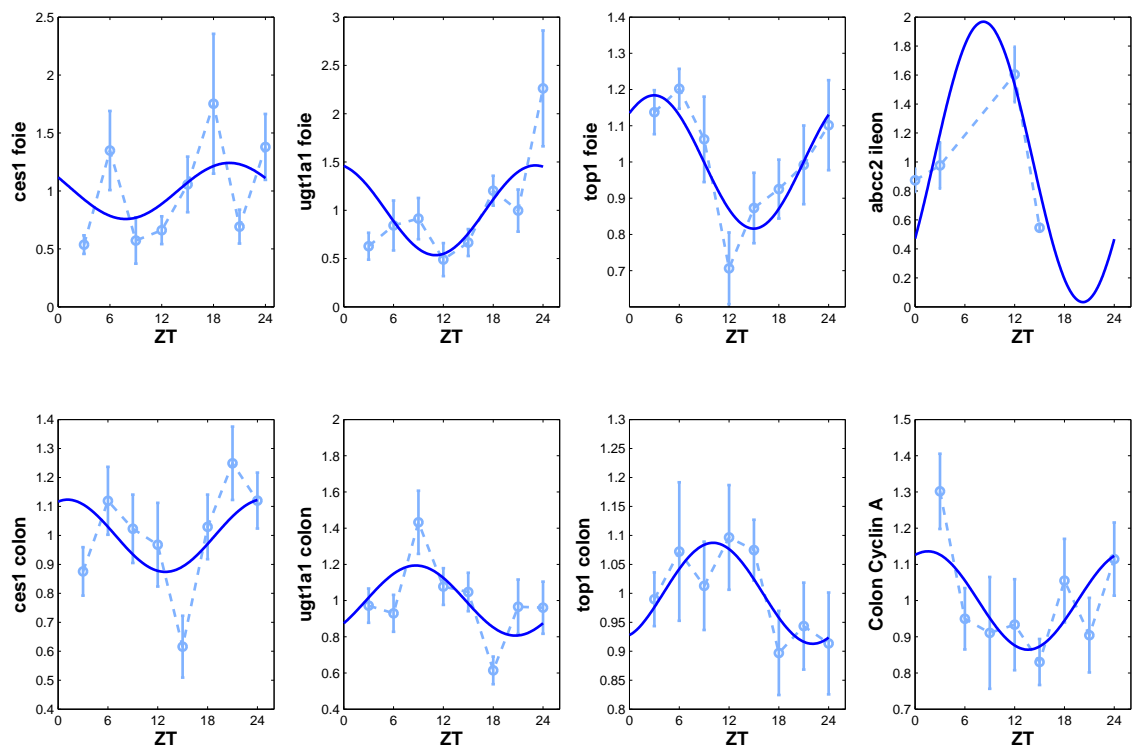


FIG. 3.2: **Variations circadiennes des protéines de la pharmacologie du CPT11, chez la classe 2** Les points de données sont la moyenne de 10 à 15 animaux ( $\pm$  SEM). L'équation 2.11 a été calibré aux résultats expérimentaux par une méthode de moindres carrés (cf. chapitre 5). Les valeurs de paramètres obtenues sont présentées au tableau 3.3.

## Estimation des paramètres pour la classe 2, à partir des données de la PK circadienne sanguine et tissulaire du CPT11 et du SN38

Les paramètres cinétiques du modèle "corps entier" ont été estimés par comparaison aux données de PK sanguine et tissulaire du CPT11 et du SN38, après injection de CPT11 aux pire et meilleure heures circadiennes de tolérabilité. L'estimation des paramètres a été réalisée par une méthode des moindres carrés, la tâche de minimisation étant effectuée par l'algorithme CMAES (cf. chapitre 5).

Pour l'étude expérimentale de la PK du CPT11 et du SN38, les souris ont été synchronisées en LD 12 :12. Pour la classe 2, l'irinotecan a été administré par intraveineuse à ZT11 (meilleure heure de tolérabilité) et ZT23 (pire heure), à la dose de 50 mg/kg. Les animaux ont été sacrifiés 30 min, 1, 2, 6 et 18 h après l'injection du médicament et les concentrations de CPT11 et SN38 ont été mesurées dans le sang, le foie, l'intestin, la moëlle osseuse et la tumeur ([101]).

Pour chaque compartiment, la concentration expérimentalement observée de CPT11 est comparée à la variable mathématique la représentant dans l'organe :  $CPT_{organe}$ . Les concentrations de SN38 sont comparées à la somme  $SN_{organe} + COMPL + Icompl$  puisque la méthode expérimentale utilisée évalue la totalité du SN38 présent dans le milieu intracellulaire. Les paramètres sont recherchés de sorte que les concentrations mesurées et simulées soient les plus proches possibles, pour les cinq points de temps (30 min, 1, 2, 6 et 18 h) après l'injection aux deux heures circadiennes (ZT11 et ZT23).

Par souci de simplification, les paramètres d'absorption et de transport actif du SN38G ont été considérés identiques à ceux du SN38, à l'exception de ceux de la circulation entéro-hépatique. De plus, nous avons supposé que les paramètres  $Km$  des cinétiques michaeliennes étaient identiques dans tous les compartiments. Nous les avons supposés égaux aux valeurs déterminées par l'étude sur les cellules Caco-2 (cf. tableau 2.2). Ainsi nous avons fixé  $K_{CES} = 146\mu M$ ,  $K_{UGT} = 2.85\mu M$  et les Km de tous les transporteurs de CPT11 et SN38 respectivement à  $47.8\mu M$  et  $1.6\mu M$

Les valeurs de paramètres de la PD utilisés sont celles déterminées par l'étude sur les cellules Caco-2 présentées au chapitre 2 (cf. tableau 2.2).

Les volumes des organes sont extraits de la littérature ([105, 101]) :  $V_{sang} = 1.7$  mL ;  $V_{foie} = 1.3$  mL ;  $V_{int} = 1.5$  mL ;  $V_{moel} = 1.8$  mL ;  $V_{NET} = 16$  mL ;  $V_{tumeur} = 1$  mL.

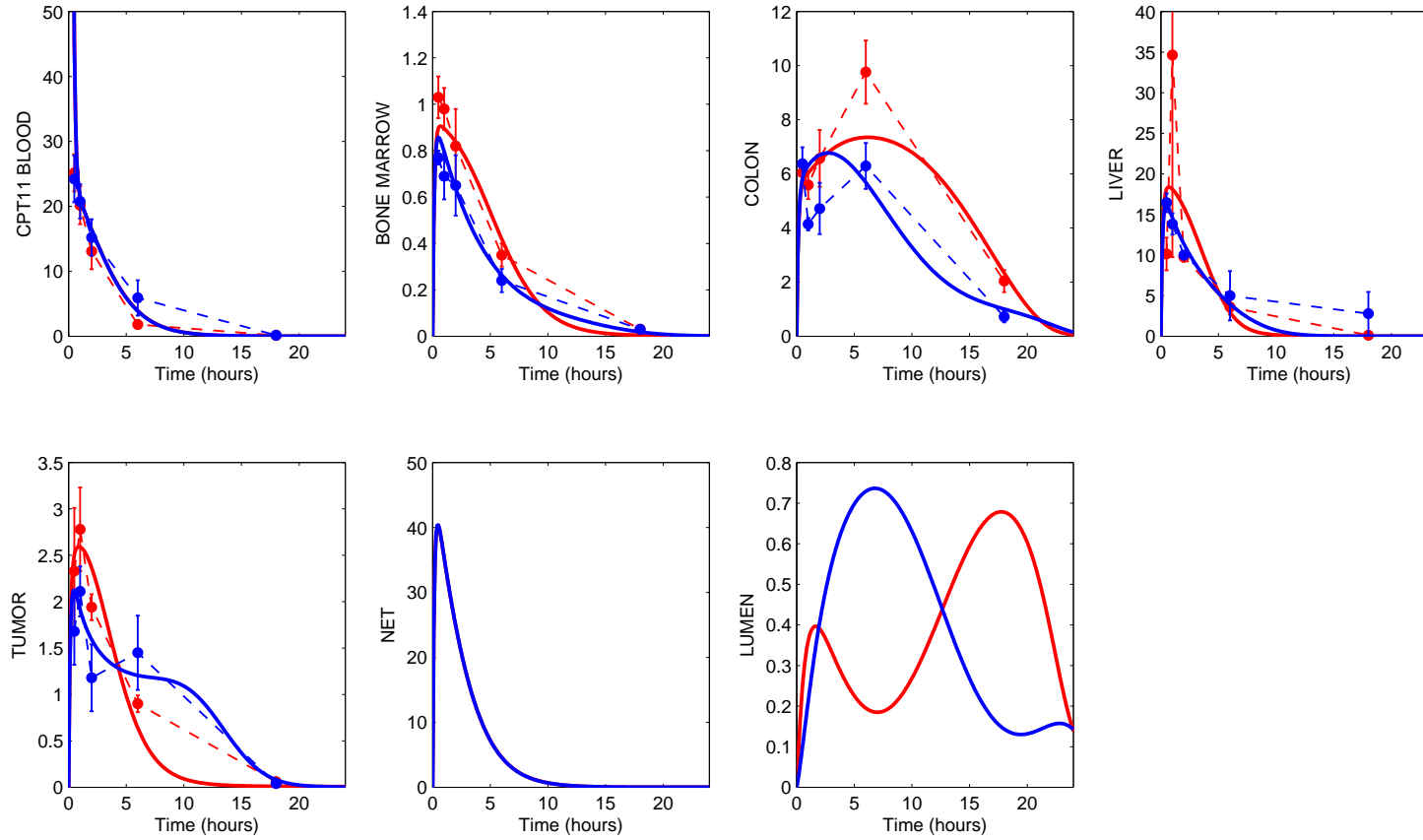


FIG. 3.3: Pharmacocinétique sanguine et tissulaire du CPT11 chez la classe 2, après injection de CPT11 à ZT11 (bleu) et ZT23 (rouge). Les points de données représentent la moyenne de 10 à 15 souris, ( $\pm SEM$ ). Les courbes continues représentent les simulations du modèle calibré aux données par une méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5).

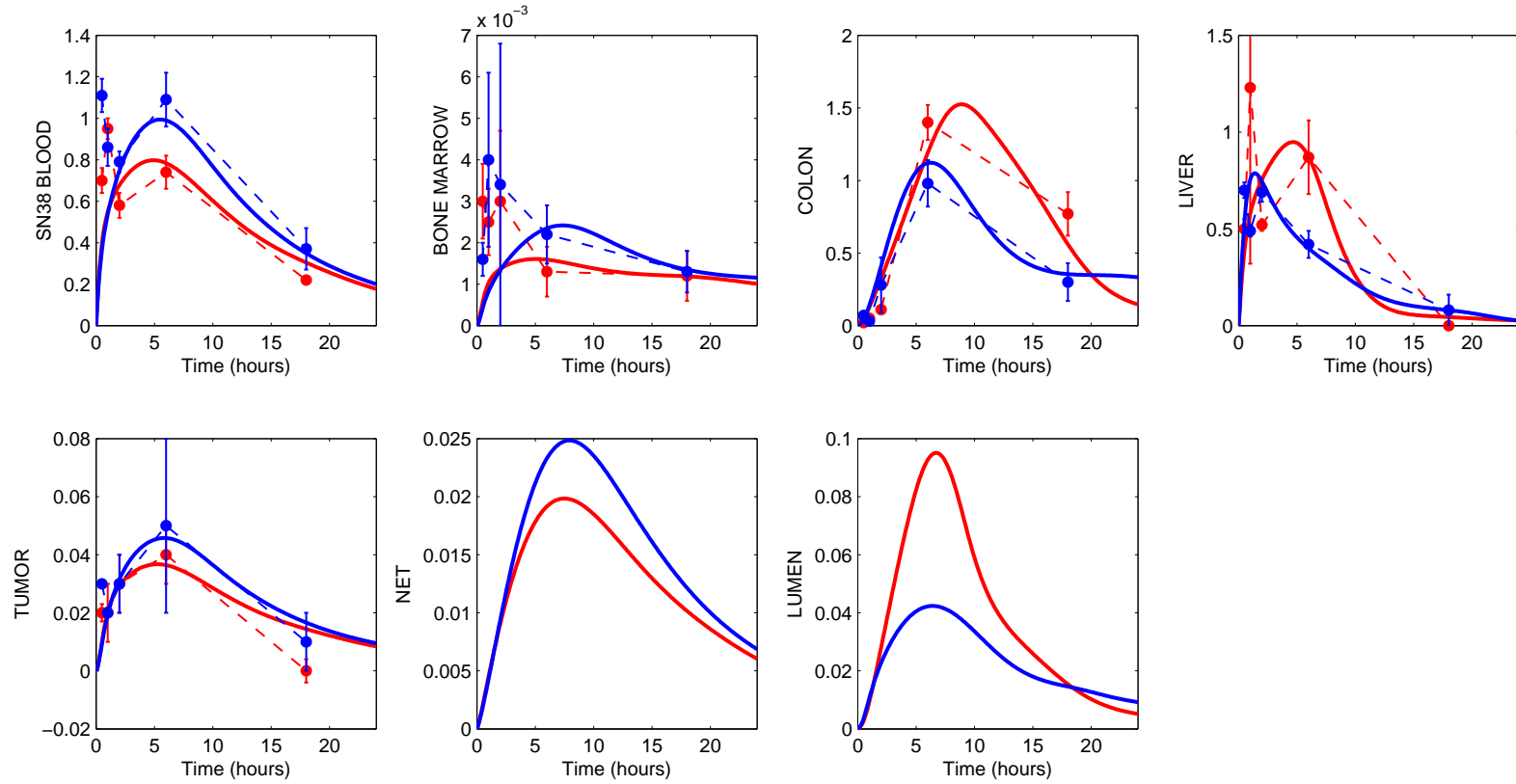


FIG. 3.4: **Pharmacocinétique sanguine et tissulaire du SN38 chez la classe 2, après injection de CPT11 à ZT11 (bleu) et ZT23 (rouge).** Les points de données représentent la moyenne de 10 à 15 souris, ( $\pm SEM$ ). Les courbes continues représentent les simulations du modèle calibré aux données par une méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5).

Absorption cellulaire ( $h^{-1}$ )	
$k_{upCPT\_foie}$	$= 0.16, k_{upSN\_foie} = 0.05$
$k_{upCPT\_int}$	$= 0.048, k_{upSN\_int} = 0.48$
$k_{upCPT\_moel}$	$= 0.008, k_{upSN\_moel} = 0.9$
$k_{upCPT\_NET}$	$= 0.4, k_{upSN\_NET} = 0.23$
$k_{upCPT\_tumeur}$	$= 0.021, k_{upSN\_tumeur} = 0.45$
Transport actif ( $\mu M h^{-1}$ )	
$V_{foie\_sangCPT}$	$= 14$
$V_{foie\_sangSN}$	$= 28$
$V_{moel\_sangCPT}$	$= 17$
$V_{moel\_sangSN}$	$= 6000$
$V_{NET\_sangCPT}$	$= 60$
$V_{NET\_sangSN}$	$= 8$
$V_{tumeur\_sangCPT}$	$= 17$
$V_{tumeur\_sangSN}$	$= 30$
$V_{int\_lumCPT}$	$= 60$
$V_{int\_lumSN}$	$= 0.002$
$V_{int\_lumSNG}$	$= 15$
$V_{lum\_intCPT}$	$= 0.001$
$V_{lum\_intSN}$	$= 15$
$V_{lum\_intSNG}$	$= 0.001$

Bioactivation de CPT11 en SN38 ( $\mu Mh^{-1}$ )
$V_{CES\_sang} = 10.5$ $V_{CES\_foie} = 35$ $V_{CES\_int} = 0.02$ $V_{CES\_moel} = 10$ $V_{CES\_tumeur} = 0.001$
Glucuronidation de SN38 en SN38G ( $\mu Mh^{-1}$ )
$V_{UGT\_foie} = 80$ $V_{UGT\_int} = 20$ $V_{UGT\_moel} = 5000$ $V_{UGT\_tumeur} = 300$
Circulation entéro hépatique ( $\mu Mh^{-1}$ )
$V_{bileCPT} = 0.01$ $V_{bileSN} = 0.4\mu M$
$\beta$ -glucuronidase
$V_{beta} = 20\mu Mh^{-1}, K_{beta} = 10\mu M$
Clairances ( $h^{-1}$ )
$k_{renCPT} = 4.2$ $k_{renSN} = 0.3$ $k_{renSNG} = 0.5$  $k_{intCPT} = 1$ $k_{intSN} = 8$

TAB. 3.4: **Valeurs des paramètres du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11** Les paramètres ont été estimés par une méthode des moindres carrées, en utilisant l'algorithme CMAES pour la tâche de minimisation (cf. chapitre 5)

Les valeurs des paramètres obtenues sont présentées au tableau 3.4. Le modèle ainsi calibré reproduit de façon satisfaisante les données expérimentales (Figure 3.3 et 3.4). Cependant, le rebond de la concentration intestinale de CPT11, après injection à ZT11 n'est pas capturé par la modélisation. Les concentrations sanguines de SN38 sont sous-estimées par le modèle dans les premières heures après l'injection,

gènes	A (u.a.)	$\phi$ (h)
$ABC\_CPT_{foie\_sang}$	0.9	6.5
$ABC\_SN_{foie\_sang}$	0.75	16
$ABC\_CPT_{int\_lum}$	0.2	7.8
$ABC\_SN_{int\_lum}$	0.6	22.5
$ABC\_CPT_{moelle\_sang}$	0.4	9.78
$ABC\_SN_{moelle\_sang}$	0	-
$UGT_{moelle}$	0.5	7
$ABC\_CPT_{tumeur\_sang}$	0.9	6.2
$ABC\_SN_{tumeur\_sang}$	0	-
$CES_{tumeur}$	0	-
$UGT_{tumeur}$	0	-

TAB. 3.5: **Paramètres des rythmes circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11.** Les paramètres sont estimés à partir des données de PK sanguine et tissulaire.

ce qui est probablement à l'origine de la sous-estimation des concentrations de SN38 dans la moëlle osseuse durant ce laps de temps.

Le CPT11 semble être absorbé principalement par les cellules du foie, et du compartiment NET. Une forte absorption du SN38 est observée dans les organes cibles (colon et moelle osseuse) et dans la tumeur, comparé aux autres organes.

Le CPT11 est principalement bioactivé en SN38 dans le foie. La métabolisation semble également active dans le sang et la moëlle osseuse. L'activité des carboxylés-térases a été estimées quasi-nulle dans le colon, compartiment dans lequel le SN38 n'apparaît que 2 heures après l'injection, malgré la présence du CPT11 30 min après celle-ci. Enfin, la tumeur ne semble pas métaboliser le CPT11 en SN38.

La désactivation du SN38 en SN38G sous l'action des enzymes UGTs est estimée très active dans la moëlle osseuse. Elle se produit également dans la tumeur, le foie et le colon.

### 3.4 Discussion et perspectives

Un modèle "corps entier" à base physiologique de la PK-PD du CPT11 a été conçu. L'estimation de ses paramètres a été réalisée pour la classe 2, pour laquelle



le modèle calibré fournit des résultats numériques cohérents avec les données expérimentales. La même étude est en cours pour les classes 1 et 3 de chronotoxicité. La détermination d'un ensemble de paramètres pour chaque classe permettra leur comparaison dans le but de mettre en évidence des différences au niveau moléculaire. Le modèle permettra également l'investigation de biomarqueurs moléculaires dont les rythmes seraient responsables des variations circadiennes d'activité du CPT11. L'optimisation de l'administration chronomodulée de l'irinotecan pour chaque classe de chronotoxicité est la principale perspective. L'application de procédures d'optimisation sur le modèle calibré permettra la détermination de schémas d'injection optimaux, comme cela a été réalisé pour l'étude *in vitro* au chapitre 2.

Dans le compartiment tumoral, l'estimation des variations circadiennes des protéines impliquées dans la PK du CPT11 nous permet de conclure à un rythme uniquement dans l'efflux du CPT11. Cela suggère qu'il n'y aurait peut-être pas d'organisation circadienne dans la tumeur, et que ces différences circadiennes de pharmacocinétique seraient la conséquence de variations de la perméabilité des cellules saines environnantes. Ainsi, un rythme de l'absorption du CPT11 et de ses métabolites devrait être envisagé dans le modèle mathématique.

Des données de chronotoxicités intestinale et hématologique, ainsi que des données de chronoefficacité antitumorale sont disponibles pour les trois classes. Elles vont être utilisées pour évaluer les paramètres circadiens de la TOP1 et de la CycA dans ces trois compartiments. Les paramètres de PD, directement inférés de l'étude sur les cellules Caco-2, pourront également être adaptés.

Des expériences in-vitro sur du sang humain ont montré que le CPT-11 et le SN-38 se liaient à certains composants sanguins : protéines plasmatiques, plaquettes et globules rouges ([108, 109]). L'étude conduite dans [109] rapporte une fixation plasmatique du CPT-11 à hauteur de 60 à 66% dans une large gamme de concentrations : 100 à 4000 ng/mL, tandis que la fixation du SN-38 s'est révélée plus élevée puisque comprise entre 94 et 96% pour des concentrations allant de 50 à 200 ng/mL. Ces fractions libres et liées vont être intégrées dans une future version du modèle. De même, les voies de métabolisation du CPT11 par les cytochromes P450 n'ont pas été considérées dans cette étude et devraient être intégrées au modèle.



## Chapitre 4

# Étude du contrôle de l'oncogène SRC sur la voie mitochondriale de l'apoptose

### 4.1 Motivations

L'étude moléculaire des tissus normaux et tumoraux d'un patient permet la mise en évidence de mutations critiques expliquant la différence de comportement des cellules saines et cancéreuses en réponse aux médicaments. Nous proposons ici une approche combinée expérimentale et mathématique dont le but est d'optimiser la stratégie thérapeutique à adopter pour chaque patient, en fonction de son profil moléculaire. Il s'agit d'exploiter de façon optimale les différences entre tissus sains et cancéreux dans le but de cibler la tumeur et limiter la toxicité du traitement.

Nous mettons ici en oeuvre cette approche pluridisciplinaire *in vitro* et *in silico* pour déterminer la stratégie optimale dans le cas de fibroblastes de souris NIH-3T3 non transformés, qui joueront le rôle des cellules saines, et des mêmes cellules transfectées avec l'oncogène v-src, qui représenteront les cellules cancéreuses. Cette mutation a été choisie parce que la tyrosine kinase SRC est dérégulée dans de nombreux cancers tels que le cancer colorectal, le cancer du sein, des poumons, de la prostate et du pancréas ([111, 112, 113]).

L'étude expérimentale, à l'échelle moléculaire, des fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés v-src a été précédemment réalisée et révèle des différences au niveau de la voie mitochondriale de l'apoptose. La surexpression de la tyrosine kinase SRC dans les cellules transformées a pour conséquence l'activation de la voie RAS / RAF/ MEK1/2 / ERK1/2 qui favorise la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BIK, menant à son ubiquitylation et dégradation par le protéasome. La quantité de BIK est ainsi fortement diminuée dans les cellules v-src, ce qui pourrait être à l'origine de leur résistance à la plupart des traitements antitumoraux ([114]). Plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines présentant une dérégulation de c-src montrent les mêmes mécanismes moléculaires résultant en une résistance à l'apoptose ([114]).

Notre étude a pour but la détermination de stratégies thérapeutiques qui annihilent cette résistance, en engendrant une tolérabilité acceptable. Pour cela, nous avons entrepris une approche de biologie systémique : un modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose a été construit à partir des données de la littérature et des résultats expérimentaux existants sur les cellules NIH-3T3. Il a ensuite guidé de nouvelles investigations expérimentales afin d'étudier la réponse moléculaire des cellules transformées ou non, à un stress apoptotique. Enfin, le modèle a été calibré aux résultats biologiques obtenus et utilisé dans des procédures théoriques d'optimisation dont le but est la détermination de stratégies thérapeutiques optimales pour le système biologique étudié.

## 4.2 L'oncogène SRC et la voie mitochondriale de l'apoptose

### 4.2.1 La tyrosine kinase SRC

La tyrosine kinase SRC est impliquée dans de nombreuses fonctions de la cellule parmi lesquelles la survie cellulaire, la prolifération, la motilité ou l'adhésion ([115]). Le dérèglement de son expression a été décrit dans de nombreux cancers. Il favorise la tumorigénèse et la progression tumorale ([111, 112, 113, 116]).

Plusieurs molécules ont été développées pour annihiler la résistance due à une surexpression de SRC. Des agents thérapeutiques inhibant ces protéines, tels que le dasatinib, sont actuellement utilisés en clinique chez les patients cancéreux ([117, 118, 116]). L'herbimycine est un inhibiteur largement utilisé dans les études *in vitro*, qui cible préférentiellement la tyrosine kinase SRC ([119]).

### 4.2.2 La voie mitochondriale de l'apoptose et les protéines de la famille BCL2

La voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules de mammifères implique les protéines de la famille BCL2 qui sont habituellement regroupées en deux catégories : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques ([120]). Les protéines anti-apoptotiques, telles que BCL2, BCL-XL, ou MCL-1, inhibent les protéines pro-apoptotiques en les emprisonnant dans des complexes qui, pour la plupart, ne se dissocient pas spontanément ([121]). La catégorie des protéines pro-apoptotiques est généralement divisée en deux sous-groupes : les protéines multidomaines effectrices, de type BAX, qui sont capables de perméabiliser la membrane mitochondriale externe (MME) une fois activées, et les protéines BH3-only. La famille des BH3-only est elle-même divisée en deux sous-catégories : les protéines activatrices, telles que tBID, BIM ou PUMA, qui déclenchent l'activation des protéines effectrices ; et les protéines sensibilisatrices, qui libèrent les protéines effectrices et activatrices des complexes avec les molécules anti-apoptotiques ([123, 124]).

Les protéines de type BAX sont sous une forme inactive, en conformation spatiale fermée, en conditions non-apoptotiques. Au cours de l'apoptose, elles s'ouvrent spatialement et sont alors capables de s'insérer dans la MME. Une fois insérées dans la membrane, les molécules s'oligomérisent pour former des pores qui permettent le

relargage dans le cytoplasme de facteurs apoptogéniques tels que le cytochrome C ([125, 126, 127]). Le cytochrome C est relâché de façon rapide et irréversible dans le cytoplasme où il active la cascade de caspases qui mène la cellule à l'apoptose ([128, 121]). Moins de 10% de la quantité totale de protéines BAX semblent être activés durant l'apoptose ([126]). De plus, les molécules de BAX en conformation ouverte, mais non oligomérisées, peuvent se refermer spontanément en leur forme inactive ([129]).

Les protéines BH3 activatrices, telles que tBID, Bim et PUMA, sont capables d'activer les protéines effectrices telles que BAX ou BAK ([141, 142]). Après un stress apoptotique, le niveau d'expression de PUMA augmente durant l'apoptose, possiblement par l'activation de la protéine p53 qui favorise sa transcription ([143]). La protéine BID, quant à elle, est activée par troncature en tBID, sous l'action enzymatique de la caspase 8 ([144]).

La classification de la protéine BH3-only BIK est toujours à l'étude. Elle pourrait jouer le rôle de protéine sensibilisatrice puisque son affinité avec les molécules anti-apoptotiques est supérieure à celle des protéines BH3 activatrices, ce qui suggère qu'elle serait capable de remplacer les BH3 activatrices dans les complexes avec les molécules anti-apoptotiques ([130]). De plus, à notre connaissance, aucune interaction directe entre BIK et la protéine BAX n'a été démontrée.

Plusieurs stratégies antitumorales visent à rétablir la capacité d'apoptose des cellules cancéreuses ([131]). En particulier, des inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques, tels que l'ABT-737 ou l'oblimersen, sont actuellement évalués dans des essais cliniques ([132]). Cette stratégie est déjà utilisée en culture de cellules ([133], [134]). Une autre méthode expérimentale permettant de restaurer la capacité d'apoptose consiste à augmenter l'expression des molécules pro-apoptotiques telles que BAX, BIK ou p53 ([135, 136, 137, 138]).

### **4.3 Etude expérimentale et mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés**

Nous avons entrepris une approche combinée expérimentale et mathématique dont le but est la détermination de stratégies thérapeutiques optimales dans le cas des fibroblastes NIH-3T3 parentaux, qui représentent les cellules saines, et les fibroblastes transformés v-src, qui jouent le rôle des cellules cancéreuses. Nous décrivons, tout d'abord, les résultats expérimentaux existants concernant les protéines de la famille BCL2 présentes dans les fibroblastes ([114]). Nous avons ensuite étudié mathématiquement et expérimentalement la dynamique de la protéine BIK en conditions normales, puis durant un stress apoptotique. Un modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose a été construit et calibré aux données expérimentales. Des procédures d'optimisation nous ont ensuite permis de déterminer les combinaisons de médicaments théoriquement optimales.

### 4.3.1 Méthodes expérimentales

La culture des fibroblastes parentaux et transformés v-src a été réalisée comme décrit dans [114]. La concentration d'exposition à la staurosporine était de  $2\ \mu\text{M}$ . Quand cela est indiqué, les cellules ont été pré-incubées avec du ABT-737 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 24 h avant l'exposition à la staurosporine. Les quantités de protéines ont été mesurées par immunoblot, comme décrit dans [114]. La localisation intracellulaire de la protéine BIK a été réalisée par microscopie confocale (cf. chapitre 6).

### 4.3.2 Protéines de la famille BCL2 présentes dans les fibroblastes NIH-3T3 transformés ou non.

L'expression des protéines de la famille BCL2 en conditions non-apoptotiques a été expérimentalement étudiée dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés v-src ([114]). Les protéines anti-apoptotiques présentes étaient BCL2, MCL-1 et BCL-XL. BCL2 et MCL-1 présentaient une localisation aux mitochondries, alors que BCL-XL était préférentiellement cytosolique, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Figure 4.1, [140]). BAX, la seule protéine effectrice présente, était localisée dans le cytoplasme ou faiblement liée aux mitochondries. Ses molécules ont migré aux mitochondries après le stress apoptotique ([114]).

Les seules molécules BH3 activatrices présentes étaient PUMA et BID (Figure 4.1). Les protéines BH3 sensibilisatrices exprimées dans les fibroblastes NIH-3T3 étaient BIK et BAD. BAD ne semble pas avoir joué un rôle majeur dans la réponse des cellules aux différents stress apoptotiques ([114]). BIK était localisé dans le cytoplasme en conditions non-apoptotiques (Figure 4.1).

Les différences d'expressions protéiques entre les deux lignées de fibroblastes portaient, tout d'abord, sur la quantité beaucoup plus faible de BIK dans les cellules v-src. La phosphorylation de BIK sous le contrôle de la tyrosine kinase SRC a pour conséquence une quantité de protéines BIK dans les cellules v-src environ égale à 0.2 fois celle présente dans les cellules non transformées ([114]). La quantité totale de protéines BAX est, quant à elle, augmentée d'un facteur 2.2 dans les cellules v-src, comparé aux cellules normales, celle de BID diminuée d'un facteur 0.8, et celle de BCL2 diminuée d'un facteur 0.6 (Figure 4.1, [114]).

### 4.3.3 Cinétique de BIK en conditions non-apoptotiques

Nous avons, tout d'abord, construit un modèle mathématique de la cinétique de la protéine BIK en conditions non-apoptotiques. Nous notons respectivement  $[BIK]$  et  $[BIK_p]$  les concentrations intracellulaires de protéines BIK et BIK phosphorylée, c'est-à-dire associée à un ou plusieurs groupes phosphate ( $PO_4$ ).

Le niveau d'expression de BIK est supposé résulter de la somme d'une formation, ayant lieu à la vitesse  $k_{fBIK}$ , et d'une disparition de  $[BIK]$  par phosphorylation. Cette phosphorylation se produit soit spontanément, à une vitesse  $k_{dBIK}$ , soit consécutivement à l'activation de l'oncogène SRC, qui est modélisée par une cinétique de Michaelis-Menten de paramètres  $V_p$  et  $K_p$  (Figure 4.2, [114]). Nous considérons que la phosphorylation spontanée des protéines BIK a lieu au même

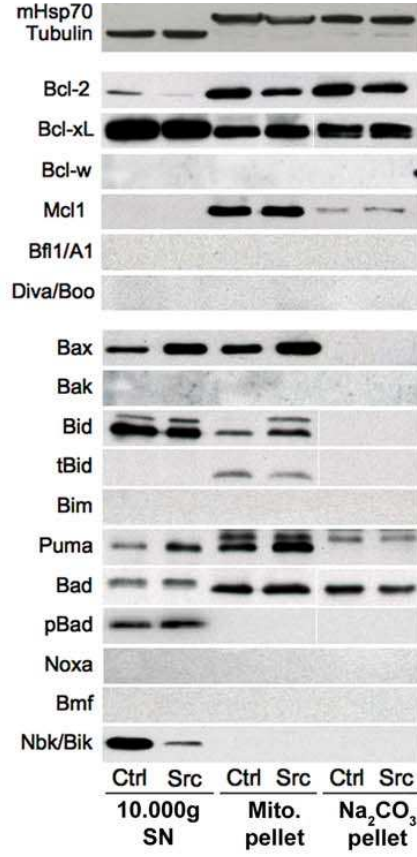


FIG. 4.1: **Protéines de la famille BCL2 présentes dans les cellules NIH-3T3 contrôles ou transformées v-src, en conditions non-apoptotiques.** 10000g *SN* : protéines dans le cytoplasme; *Mito. pellet* : protéines faiblement liées aux mitochondries; *Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pellet* : protéines insérées dans la MME. Figure adaptée de [114].

taux dans les fibroblastes normaux et transformés. La concentration de molécules d'ATP, nécessaires à la phosphorylation, a été supposée beaucoup plus grande que celle de BIK et a donc été considérée constante. Elle est implicitement intégrée aux paramètres  $k_{dBIK}$  et  $V_p$ . Les protéines  $BIK_p$  sont ensuite ubiquitinées avant leur dégradation par le protéasome :

$$\frac{d[BIK]}{dt} = k_{fBIK} - k_{dBIK}[BIK] - \frac{V_p[BIK]}{K_p + [BIK]} \quad (4.1)$$

$$\frac{d[BIK_p]}{dt} = k_{dBIK}[BIK] + \frac{V_p[BIK]}{K_p + [BIK]} - k_{Ub}[BIK_p] \quad (4.2)$$

$k_{Ub}$  n'a pas d'influence sur la cinétique de BIK et a donc été arbitrairement fixé à 1. Les paramètres  $k_{dBIK}$ ,  $V_p$  et  $K_p$  ont été estimés pour les cellules normales,

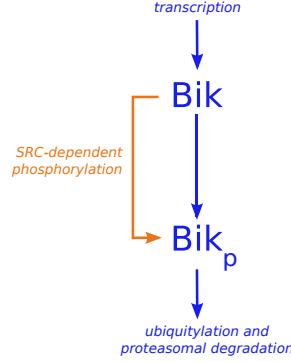


FIG. 4.2: **Cinétique de BIK en conditions normales** Les protéines *BIK* sont phosphorylées ( $BIK_p$ ) avant leur ubiquitination et dégradation par le protéasome. Cette phosphorylation s'effectue spontanément dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux, et est augmentée sous l'activité enzymatique des tyrosines kinases SRC dans les cellules transformées v-src.

et les cellules transformées v-src, exposées ou non à l'herbimycine, un inhibiteur de tyrosines kinases SRC. Pour cela, nous avons comparé le modèle mathématique aux données expérimentales présentées à la figure 3 de [114] et avons également imposé que le ratio des concentrations de BIK entre les cellules v-src et normales soit proche de 0.2 ([114], Figure 4.3).

Pour les expériences de la figure 3 de [114], la formation de protéines est totalement inhibée, ce qui revient à fixer  $k_{fBik} = 0$  dans l'équation 4.1. Une large quantité de BIK, que nous noterons  $BIK_{init}$ , est transfectée aux cellules à l'instant initial, et la quantité de BIK est ensuite mesurée durant 4 h. Nous recherchons donc simultanément les valeurs optimales de  $BIK_{init}$ ,  $k_{dBIK}$ , et de  $V_p$  et  $K_p$  pour les cellules parentales, et les cellules transformées, en présence ou non d'herbimycine. L'inhibiteur de SRC est modélisé par une diminution de 98% de la valeur de  $V_p$  dans les fibroblastes v-src exposés ([119]). La méthode des moindres carrés a été utilisée pour l'estimation de paramètres (cf chapitre 5).

La valeur obtenue du paramètre de phosphorylation spontanée est  $k_{dBIK}=0.004 \text{ min}^{-1}$ . La phosphorylation sous le contrôle des kinases SRC est estimée presque nulle dans les cellules non transformées :  $V_{p\_normal} \approx 0 \text{ nM.min}^{-1}$ . Au contraire, elle est largement prédominante dans les cellules v-src où  $V_p=12.1 \text{ nM.min}^{-1}$  et  $K_p=403.7 \text{ nM}$ , ce qui entraîne  $\frac{V_p}{K_p} \approx 8k_{dBIK}$ .

Ces valeurs de paramètres donne un ratio des concentrations totales de BIK entre cellules normales et transformées égal à 0.21. La valeur estimée de  $BIK_{init}$  est  $640 \mu \text{ M}$ .  $k_{fBIK}$  est arbitrairement fixé à  $0.4 \text{ nM.min}^{-1}$  de sorte que sa concentration totale soit approximativement égale à  $110 \text{ nM}$  dans les cellules non transformées. Le modèle calibré avec les valeurs estimées des paramètres reproduit de façon fidèle les résultats expérimentaux (Figure 4.3).



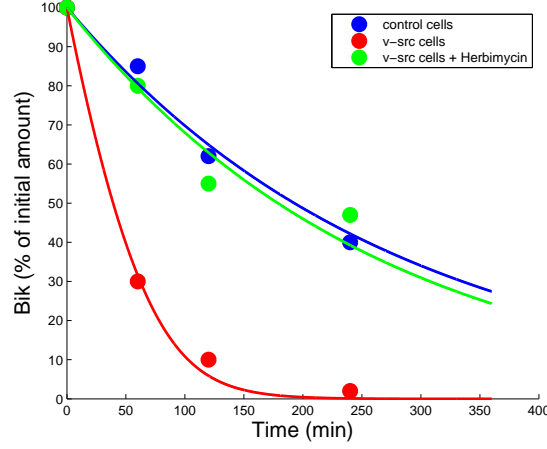


FIG. 4.3: **Dégradation de la protéine BIK dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés v-src.** Les points représentent les résultats expérimentaux de [114]. Les lignes continues sont les simulations du modèle mathématique (Équations 4.1 et 4.2), calibré aux données par la méthode des moindres carrés (cf chapitre 5).

Les valeurs théoriques des concentrations de  $[BIK]$  et  $[BIK_p]$  en conditions non-apoptotiques, sont celles de l'état stationnaire du système :

$$[BIK]^* = \frac{1}{2k_{dBIK}} (A + \sqrt{A^2 + 4k_{dBIK}K_p k_{fBIK}})$$

$$[BIK_p]^* = \frac{k_{fBIK}}{k_{Ub}}$$

où  $A = k_{fBIK} - k_{dBIK}K_p - V_p$ .

Pour les cellules non transformées, dans lesquelles  $V_p$  est approximativement égal à zéro, l'état d'équilibre devient :

$$[BIK]^{*H} = \frac{k_{fBIK}}{k_{dBIK}}$$

$$[BIK_p]^{*H} = \frac{k_{fBIK}}{k_{Ub}}.$$

#### 4.3.4 Comportement de BIK suite à un stress apoptotique

Nous avons, ensuite, étudié le comportement de la protéine BIK en réponse à un stress apoptotique. Le stress considéré est une exposition à l'agent anticancéreux staurosporine, à la concentration de  $2 \mu\text{M}$ , durant 8 h.

BIK est présent dans les cellules normales en conditions non-apoptotiques, ce qui suggère que la protéine est soit en trop faible quantité pour déclencher l'apoptose, soit a besoin d'être activée ou libérée d'un organelle pour pouvoir remplir sa fonction pro-apoptotique (Figure 4.1).

La première hypothèse que nous avons mathématiquement étudiée est une augmentation de la quantité de BIK en réponse au signal de mort. Nous nous sommes

plus particulièrement intéressé au cas où seule la dégradation de BIK serait diminuée par le stress apoptotique, sa vitesse de formation restant inchangée, et ce pour les cellules normales et transformées. Dans notre modèle mathématique, cela revient à mettre à zéro les deux voies de phosphorylation de BIK. L'équation 4.1 peut alors être résolue analytiquement :

$$[BIK](t) = BIK_0 + k_{fBIK}t = (1 + k_{dBIK}t)BIK_0$$

où  $BIK_0$  est la concentration initiale de BIK, supposée égale à sa concentration d'équilibre, soit  $[BIK]^{*H}$  pour les cellules parentales et  $[BIK]^*$  pour les cellules v-src.

Aucune apoptose n'a été détectée dans les cellules NIH-3T3 parentales et transformées dans les 6 premières heures d'exposition à la staurosporine (données non exposées). Nous fixons donc  $t=360$  min et obtenons  $[BIK](360) = 2.2BIK_0$ , ce qui signifie que la concentration de BIK ne pourrait que doubler en 6 h, aussi bien dans les cellules normales, que dans les cellules transformées.

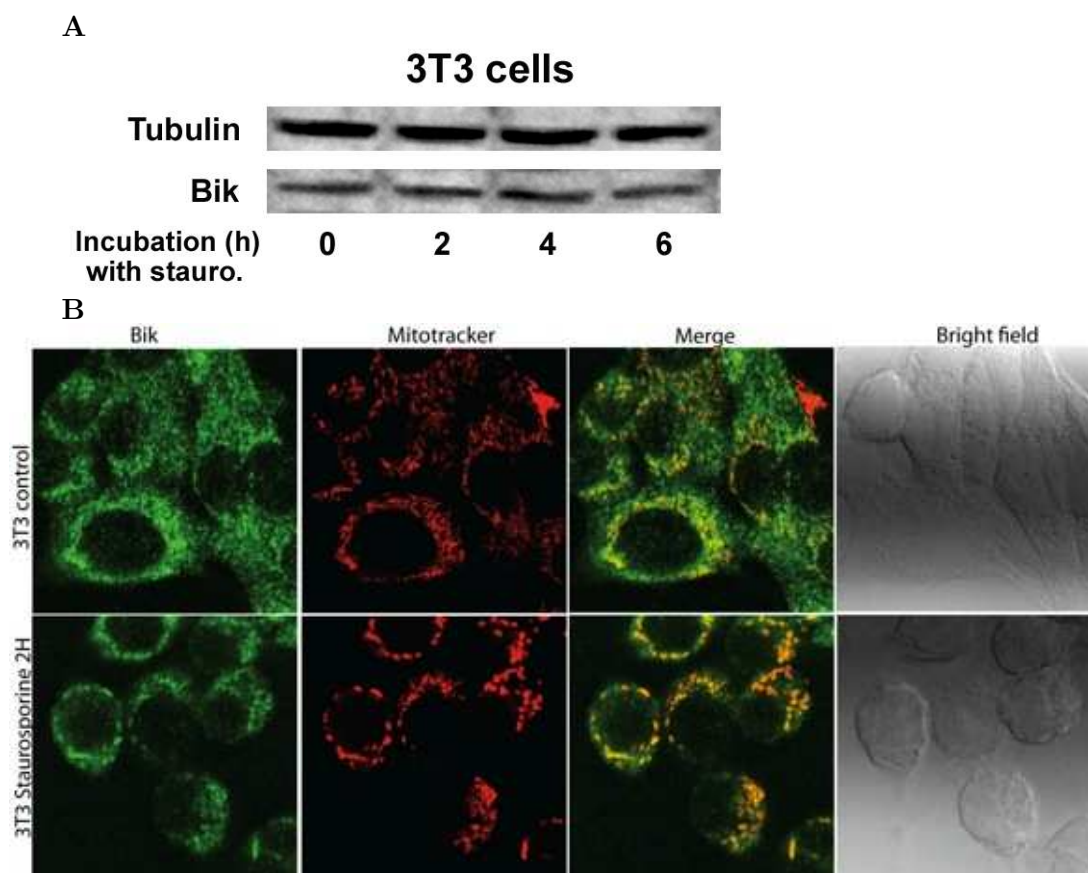
Pour vérifier expérimentalement le comportement de BIK en réponse à un stress, nous avons mesuré l'évolution temporelle de la quantité de protéines BIK dans des cellules NIH-3T3 normales, au cours de l'exposition à la staurosporine. Le niveau de protéines BIK n'a pas présenté de hausse significative pendant l'exposition au médicament, ce qui nous permet de rejeter l'hypothèse d'une augmentation de la quantité de protéines BIK durant l'apoptose, en particulier par une simple inhibition de sa dégradation (Figure 4.4 A).

La deuxième hypothèse que nous avons envisagée est une activation ou libération des protéines BIK dans le cytoplasme. Une large partie des molécules de BIK s'est relocalisée aux mitochondries dans les cellules normales NIH-3T3 durant une exposition de 2 h à la staurosporine (Figure 4.4 B). Cette relocalisation en réponse à un stress apoptotique pourrait être interprétée comme une libération de BIK du reticulum endoplasmique (RE), où il semble être localisé en conditions normales ([145]).

Nous avons modélisé cette relocalisation par les équations 4.3 et 4.4 dans lesquelles  $[BIK_{mito}]$  représente la concentration de protéines BIK qui ont migré aux mitochondries. Cette migration se produit au taux  $k_{locBIK}$ . Nous avons considéré qu'approximativement 50% des molécules de BIK se situent aux mitochondries après 2 h d'exposition au médicament, ce qui permet d'estimer  $k_{locBIK}=0.006 \text{ min}^{-1}$  (Figure 4.4 B).

#### 4.3.5 Modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose

Nous avons ensuite construit un modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les fibroblastes parentaux et transformés v-src. Seules les protéines de la famille BCL2 dont la présence a été expérimentalement démontrée dans les cellules NIH-3T3 ont été modélisées. Les protéines anti-apoptotiques sont donc BCL2, BCL-XL et MCL-1. La seule protéine pro-apoptotique effectrice est BAX. Les BH3 activateurs sont PUMA et BID. Les BH3 sensibilisateurs sont BIK et



**FIG. 4.4: Évolution de la protéine BIK en réponse à un stress apoptotique.**

**A** Immunoblot de la quantité de BIK après une exposition à la staurosporine durant 2, 4 et 6 h. **B** Localisation de BIK dans les cellules normales NIH-3T3 en absence de médicament et après une exposition à la staurosporine de 2 h. Les mitochondries sont marquées par un Mitotracker (rouge). BIK endogène a été marqué par un anti-BIK-BH3 et révélé par un anticorps secondaire marqué FITC (vert) (cf. chapitre 6). La couleur jaune indique la colocalisation.

BAD, mais BAD est négligé dans la mesure où son inhibition ne modifie pas la réponse des cellules à un stress apoptotique ([114]).

Par souci de simplification, nous notons  $[BCL2]$  la concentration cumulée de toutes les protéines anti-apoptotiques considérées.  $[BAX_{inact}]$  représente la concentration de molécules de BAX inactive, en conformation spatiale fermée, principalement localisées dans le cytoplasme, ou faiblement liées aux mitochondries.  $[BAX_{link}]$  est la concentration de protéines BAX en conformation spatiale ouverte et insérées dans la MME. Ces molécules sont donc candidates à l'oligomérisation.  $[BAX_{oligo}]$  représente la concentration de molécules de BAX oligomérisées qui forment des pores dans la MME.  $[BH3_a]$  est la concentration cumulée de PUMA et tBID. Toutes les concentrations sont exprimées en nM.

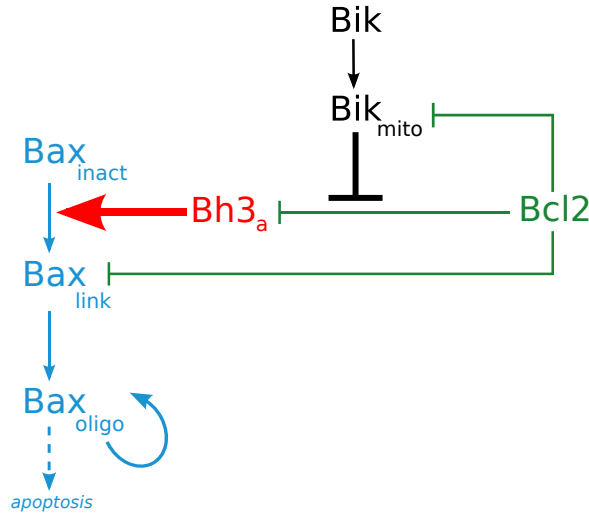


FIG. 4.5: Réactions considérées de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules NIH-3T3. En réponse à un stress apoptotique, *BIK* se relocalise aux mitochondries (*BIK<sub>mito</sub>*) et inhibe l'activité anti-apoptotique de *BCL2* sur les protéines BH3 activatrices *BH3<sub>a</sub>*. Les molécules libres de *BH3<sub>a</sub>* activent ensuite les protéines *BAX<sub>inact</sub>* en *BAX<sub>link</sub>* qui peuvent désormais se lier fortement à la MME. Les molécules de *BAX<sub>link</sub>* s'oligomérisent ensuite entre elles et avec les molécules de *BAX* déjà oligomérisés (*BAX<sub>oligo</sub>*), dans un processus autocatalytique. Les protéines *BAX<sub>oligo</sub>* créent des pores dans la MME qui permettent le relargage du cytochrome C dans le cytosol, menant ainsi la cellule à l'apoptose. Les protéines *BCL2* sont également capables d'inhiber *BAX<sub>link</sub>* et *BIK<sub>mito</sub>*.

Nous avons considéré que [*BCL2*] n'était pas capable d'interagir avec les molécules de BAX spatialement fermées ou oligomérisées, ce qui signifie qu'il n'inhibe BAX que sous sa forme [*BAX<sub>link</sub>*]. [*BCL2*] emprisonne également [*BH3<sub>a</sub>*] et [*BIK<sub>mito</sub>*] dans des complexes binaires. Nous avons supposé que [*BCL2*] ne pouvait pas se lier aux molécules de BIK situées dans le RE.

[*BH3<sub>a</sub>*] est libéré des complexes avec [*BCL2*] par [*BIK<sub>mito</sub>*]. Il active ensuite [*BAX<sub>inact</sub>*] en [*BAX<sub>link</sub>*]. Cette activation se produit d'une manière catalytique, dans laquelle [*BH3<sub>a</sub>*] n'est pas consommé, et suit donc une cinétique de Michaelis-Menten. Ce mécanisme est connu sous le nom de "hit and run" ([146]). Les molécules de [*BAX<sub>link</sub>*] s'oligomérisent ensuite pour devenir des molécules de [*BAX<sub>oligo</sub>*]. Deux protéines de [*BAX<sub>link</sub>*] peuvent s'associer mais cette réaction se produit à un faible taux. Elle déclenche un processus autocatalytique beaucoup plus rapide dans lequel les molécules de [*BAX<sub>oligo</sub>*] recrutent elles-mêmes d'autres protéines [*BAX<sub>link</sub>*] pour l'oligomérisation. [*BAX<sub>link</sub>*] peut spontanément revenir à sa conformation spatiale fermée et redevenir [*BAX<sub>inact</sub>*] (Figure 4.5 et Tableau 4.1). Les réactions chimiques décrites ci-dessus se produisent de façon spontanée et ont donc été modélisées par une loi d'action de masse.

Le modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose se présente comme suit :

$$\frac{d[BIK]}{dt} = -k_{locBIK}[BIK] \quad (4.3)$$

$$\frac{d[BIK_{mito}]}{dt} = k_{locBIK}[BIK] - k_{inact2}[BIK_{mito}][BCL2] - k_{free}[BIK_{mito}][BH3_aBCL2] \quad (4.4)$$

$$\frac{d[BIK_{mito}BCL2]}{dt} = k_{inact2}[BIK_{mito}][BCL2] + k_{free}[BIK_{mito}][BH3_aBCL2] \quad (4.5)$$

$$\frac{d[BID]}{dt} = -k_{BID}[BID] \quad (4.6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[BH3_a]}{dt} &= k_{BID}[BID] + k_{PUMA} - k_{dBH3}[BH3_a] - k_{inact3}[BH3_a][BCL2] \\ &+ k_{free}[BIK_{mito}][BH3_aBCL2] \end{aligned} \quad (4.7)$$

$$\frac{d[BH3_aBCL2]}{dt} = k_{inact3}[BH3_a][BCL2] - k_{free}[BIK_{mito}][BH3_aBCL2] \quad (4.8)$$

$$\frac{d[BAX_{inact}]}{dt} = -\frac{V_{open}[BH3_a][BAX_{inact}]}{K_{open} + [BAX_{inact}]} + k_{close}[BAX_{link}] \quad (4.9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[BAX_{link}]}{dt} &= \frac{V_{open}[BH3_a][BAX_{inact}]}{K_{open} + [BAX_{inact}]} - k_{close}[BAX_{link}] - k_{act1}[BAX_{link}]^2 \\ &- k_{act2}[BAX_{link}][BAX_{oligo}] - k_{inact1}[BAX_{link}][BCL2] \end{aligned} \quad (4.10)$$

$$\frac{d[BAX_{oligo}]}{dt} = k_{act1}[BAX_{link}]^2 + k_{act2}[BAX_{link}][BAX_{oligo}] \quad (4.11)$$

$$\frac{d[BAXBCL2]}{dt} = k_{inact1}[BAX_{link}][BCL2] \quad (4.12)$$

$$\frac{d[BCL2]}{dt} = -k_{inact1}[BAX_{link}][BCL2] - k_{inact2}[BIK_{mito}][BCL2] - k_{inact3}[BH3_a][BCL2] \quad (4.13)$$

La signification et la valeur de chaque paramètre sont présentées au tableau 4.1.

Le stress apoptotique considéré est une exposition à la staurosporine débutant au temps  $t=0$  et durant 8 h. Il déclenche deux processus moléculaires : la migration de BIK vers les mitochondries et l'augmentation de la formation de protéines  $BH3_a$ . Cette augmentation représente à la fois la troncature de BID en tBID et la hausse de la transcription et traduction de PUMA. Les deux processus ont été modélisés parce qu'ils présentent des cinétiques très différentes. En effet, l'activation de BID est rapide puisqu'il s'agit d'une modification post-traductionnelle. Au contraire, la synthèse de PUMA par transcription puis traduction peut prendre jusqu'à plusieurs heures. Mathématiquement,  $k_{BID}$ ,  $k_{PUMA}$  et  $k_{locBIK}$  présentent une forte augmentation à l'instant initial.

No.	Réaction	Définition	Paramètres	Valeurs
1	$BIK \longrightarrow BIK_{mito}$	Migration de BIK du RE vers les mitochondries	$k_{locBIK} (min^{-1})$	0.006
2	$BIK_{mito} + BCL2 \longrightarrow BIKBCL2$	Inhibition de BIK par BCL2	$k_{inact2}(nM^{-1}min^{-1})$	0.0004
3	$\longrightarrow BH3_a$	Formation de $tBID$ par troncature de BID durant l'apoptose	$k_{BID}(nM.min^{-1})$	0.0001
4	$\longrightarrow BH3_a$	Formation de $PUMA$ durant l'apoptose	$k_{PUMA}(nM.min^{-1})$	0.0001
5	$BH3_a \longrightarrow$	Dégradation de $BH3_a$	$k_{dBH3}(nM.min^{-1})$	0.0001
6	$BH3_a + BCL2 \longrightarrow BH3_aBCL2$	Inhibition de $BH3_a$ par BCL2	$k_{inact3}(nM^{-1}min^{-1})$	0.0003
7	$BH3_aBCL2 + BIK \longrightarrow BH3_a + BIKBCL2$	Libération de $BH3_a$ des complexes avec BCL2 par BIK	$k_{free}(nM^{-1}min^{-1})$	0.02
8	$BAX_{inact} \xrightarrow{BH3_a} BAX_{link}$	Activation de BAX par $BH3_a$	$V_{open}, K_{open}$ ( $nM.min^{-1}, nM$ )	0.01, 1
9	$BAX_{link} + BAX_{link} \longrightarrow 2BAX_{oligo}$	Oligomérisation de deux monomères de BAX	$k_{act1}(nM^{-1}min^{-1})$	0.1
10	$BAX_{link} + BAX_{oligo} \longrightarrow 2BAX_{oligo}$	Oligomérisation autocatalytique de BAX	$k_{act2}(nM^{-1}min^{-1})$	1
11	$BAX_{link} + BCL2 \longrightarrow BAXBCL2$	Inhibition de BAX par BCL2	$k_{inact1}(nM^{-1}min^{-1})$	0.008
12	$BAX_{link} \longrightarrow BAX_{inact}$	Désactivation spontanée de BAX	$k_{close}$	0.009

TAB. 4.1: **Valeurs de paramètres du modèle de la voie mitochondriale de l'apoptose.** Les paramètres ont été estimés à partir des données expérimentales de la littérature et des résultats sur les cellules NIH-3T3 de [114].

### Conservation de quantités totales

La quantité totale de protéines BIK a été supposée constante durant le stress apoptotique, ce qui a été expérimentalement démontré (Figure 4.4 A). Nous supposons également que les quantités totales de  $BAX$  et  $BCL2$  restent constantes et obtenons donc trois lois de conservations :

$$\begin{aligned}
BAX_{tot} &= [BAX_{inact}] + [BAX_{link}] + [BAX_{oligo}] + [BAXBCL2] \\
BCL2_{tot} &= [BCL2] + [BAXBCL2] + [BH3_aBCL2] + [BIK_{mito}BCL2] \\
BIK_{tot} &= [BIK] + [BIK_{mito}] + [BIK_{mito}BCL2]
\end{aligned}$$

Seulement sept des dix équations que comporte le modèle mathématique sont donc résolues, les trois variables restantes étant calculées par ces lois.

### États d'équilibre

Le modèle mathématique admet les deux états d'équilibre suivants :

Équilibre 1	Équilibre 2
$BIK^* = 0$ $BIK_{mito}^* = 0$ $BIKBCL2^* = BIK_{tot}$ $BID^* = 0$ $BH3_a^* = \frac{k_{PUMA}}{k_{dBH3}}$ $BH3_aBCL2^*$ $BAX_{inact}^* = 0$ $BAX_{link}^* = 0$ $BAX_{oligo}^* = BAX_{tot} - BAXBCL2^*$ $BAXBCL2^* = BCL2_{tot} - BIK_{tot} - BH3_aBCL2^*$ $BCL2^* = 0$	$BIK^* = 0$ $BIK_{mito}^* = 0$ $BIKBCL2^* = BIK_{tot} - BIK_{mito}^*$ $BID^* = 0$ $BH3_a^* = \frac{k_{PUMA}}{k_{dBH3}}$ $BH3_aBCL2^* = 0$ $BAX_{inact}^* = 0$ $BAX_{link}^* = 0$ $BAX_{oligo}^* = BAX_{tot} - BAXBCL2^*$ $BAXBCL2^* = BCL2_{tot} - BIKBCL2^*$ $BCL2^* = 0$

Dans ces deux états stationnaires, la totalité des molécules de BAX est activée, alors que seuls 10 à 20% des protéines BAX le sont réellement durant l'apoptose ([126]). Ces états d'équilibre ne seront donc pas atteints expérimentalement, probablement parce que d'autres événements moléculaires, qui ne sont pas pris en compte dans ce modèle, seront déclenchés. Notre étude s'est donc focalisée sur le comportement dynamique du modèle mathématique, plutôt que sur l'étude de ses équilibres.

## Modélisation de la dynamique de la population de cellules

Nous avons ensuite modélisé l'évolution temporelle d'une population de cellules soumise au stress apoptotique. Nous notons par  $n(t)$  le pourcentage de cellules survivantes à l'instant  $t$ .

Aucune prolifération cellulaire n'est supposée puisqu'un des premiers effets de la plupart des agents cytotoxiques est d'arrêter le cycle cellulaire ([139]). La mort naturelle des cellules est négligée car peu de cellules apoptotiques ont été détectées dans les fibroblastes transformés ou non, en l'absence de médicament ([114]).

Nous considérons que l'apoptose se produit de façon irréversible lorsque  $[BAX_{oligo}]$  atteint le seuil  $thres$  qui correspond à la quantité minimale de molécules de BAX oligomérisées nécessaire à la relâche du cytochrome C dans le cytoplasme. Cette supposition est modélisée dans l'équation 4.14 par une fonction de Hill qui empêche que le taux de mort ne devienne infini. L'équation pour la population de cellules survivantes s'écrit donc :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -k_{apop} \frac{[BAX_{oligo}]^a}{[BAX_{oligo}]^a + thres^a} n(t) \quad (4.14)$$

Le seuil apoptotique  $thres$  est fixé à 10% de la quantité totale de BAX, comme les données expérimentales le suggèrent ([126]).

## Estimation des paramètres

La quantité totale de  $[BIK]$  a été fixée à sa valeur d'équilibre calculée en utilisant le modèle de sa cinétique (équations 4.1 et 4.2) calibré aux données. Elle est égale à 110 nM dans les fibroblastes normaux et 25 nM dans ceux transformés v-src. La concentration totale de BAX est choisie égale à 100 nM dans les cellules normales et 2.2 fois plus élevée dans les cellules v-src ([122], Figure 4.1). La concentration totale de BCL2 a été supposée égale à 150 nM dans les cellules normales et 0.6 fois plus petite dans les cellules transformées. La quantité totale de BID a été fixée à 50 nM dans les fibroblastes parentaux, et 0.8 fois plus petite dans ceux transformés.

Les paramètres restant à déterminer du modèle de la voie mitochondriale de l'apoptose ont été estimés à partir des données expérimentales existantes ([114]), sous des contraintes réalistes inférées de la littérature ([114]). Les paramètres relatifs à l'activation de BAX  $V_{open}$  et  $K_{open}$  ont été choisis tels qu'environ 10% de la quantité totale de BAX soient activés dans les cellules parentales, après 8 h d'exposition à la staurosporine ([126]). Pour les paramètres d'oligomérisation de BAX, nous avons supposé  $k_{act1} = 10k_{act2}$  pour représenter le fort pouvoir autocatalytique des molécules de  $BAX_{oligo}$ .  $k_{inact2}$  l'affinité de BIK pour BCL2 a été supposé plus grande que  $k_{inact3}$ , celle de  $BH3_a$  pour BCL2 ([130]). Sous ces contraintes, les valeurs finales des paramètres ont été calculées par une méthode des moindres carrés, de sorte que le modèle reproduise les données expérimentales de la figure 4.7 pour une exposition à la staurosporine seule ou combinée à l'herbimycine. Les valeurs de paramètres du modèle d'apoptose sont présentées au tableau 4.1. Pour le modèle de dynamique de population, les paramètres  $a$  et  $k_{apop}$  ont été estimés à 30 et 0.01  $\text{min}^{-1}$  respectivement.

## Conditions initiales

À l'instant initial, juste avant le début du stress apoptotique, les cellules sont supposées à l'équilibre. BIK est entièrement au RE :  $[BIK]_0 = BIK^*$ ,  $[BIK_{mito}]_0 = 0$ ,  $[BIKBCL2]_0 = 0$ . Toutes les molécules de BAX sont sous leur forme inactive :  $[BAX_{inact}]_0 = BAX_{tot}$ ,  $[BAX_{link}]_0 = 0$ ,  $[BAX_{oligo}]_0 = 0$ ,  $[BAXBCL2]_0 = 0$ . Il est à remarquer que les hypothèses  $[BIKBCL2]_0 = 0$  et  $[BAXBCL2]_0 = 0$  ont été imposées par souci de simplification et peuvent ne pas être vérifiées biologiquement (cf. Figure 4.4 B pour  $[BIKBCL2]$ ). Ces complexes étant indissociables dans notre modélisation, leur concentration initiale n'a donc aucune influence sur le comportement du système. Les molécules de  $BH3_a$  présentes sont supposées en complexe avec  $[BCL2]$  :  $[BH3_aBCL2]_0 = BH3_{a_{tot}}$ . La concentration initiale de molécules  $[BCL2]$  libres est donc égale à  $[BCL2]_0 = BCL2_{tot} - BH3_{a_{tot}}$ . Le pourcentage initial de cellules survivantes est fixé à  $n(0) = 100\%$ .

Le modèle mathématique ainsi calibré aux données a été utilisé pour expliciter la réponse moléculaire des cellules à une exposition à la staurosporine (Figure 4.6). Comme attendu, la plus haute concentration de  $[BIK]$  dans les cellules normales a pour conséquence une plus importante quantité de  $[BIK_{mito}]$  et donc de molécules  $[BH3_a]$  libres. Les protéines  $[BH3_a]$  activent ensuite les protéines  $[BAX_{inact}]$  en  $[BAX_{link}]$  qui s'oligomérisent en  $[BAX_{oligo}]$ . Le niveau de  $[BAX_{oligo}]$  augmente jusqu'à atteindre le seuil apoptotique dans les cellules contrôles. L'activation de



$[BAX_{inact}]$  dans les cellules transformées v-src n'est, quant à elle, pas suffisante pour que  $[BAX_{inact}]$  dépasse le seuil de mort.

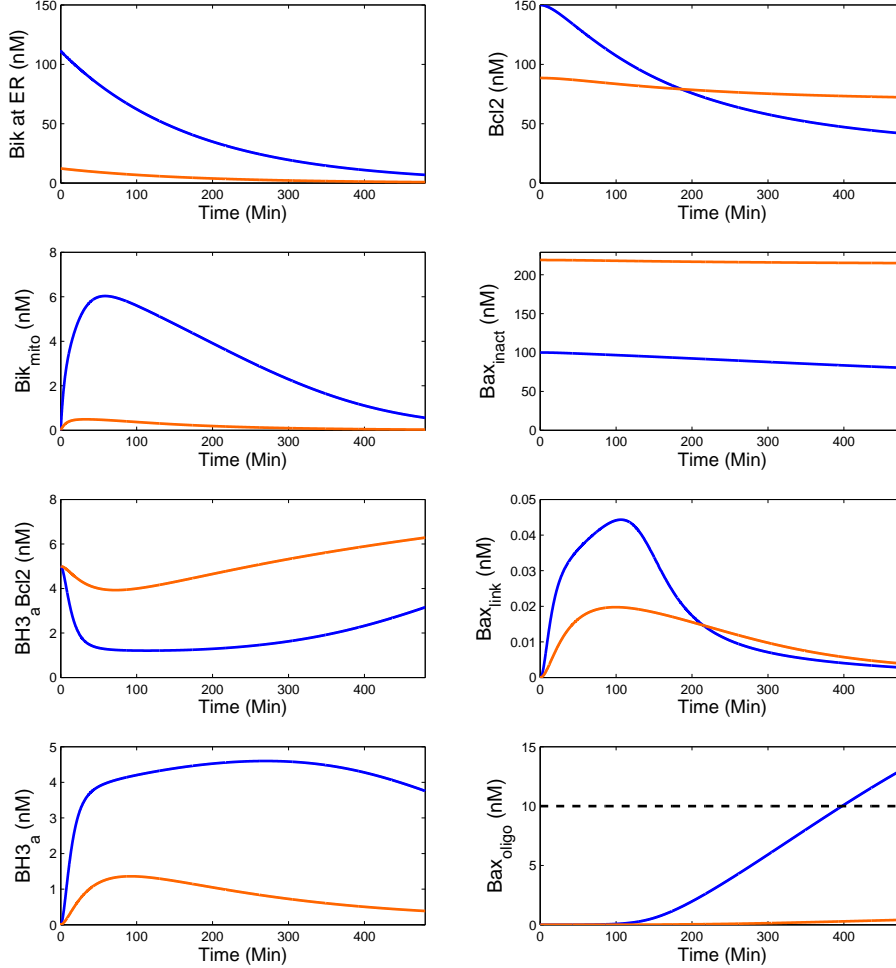


FIG. 4.6: **Simulation de la réponse des fibroblastes normaux (bleu) et transformés (orange) durant une exposition de 8 h à la staurosporine** La concentration totale de BIK au RE est supérieure dans les cellules normales et a pour conséquence une plus grande quantité de BIK aux mitochondries ( $BIK_{mito}$ ) et de molécules  $BH3_a$  libérées. Les protéines  $BH3_a$  activent ensuite  $BAX_{inact}$  en  $BAX_{link}$  qui s'oligomérisse pour former des molécules de  $BAX_{oligo}$ , jusqu'à dépassé le seuil apoptotique dans les cellules normales, mais pas dans les cellules cancéreuses.

#### 4.3.6 Stratégies thérapeutiques optimales

Dans cette partie, nous cherchons à déterminer les stratégies thérapeutiques optimales pour notre système biologique, dans lequel les fibroblastes normaux jouent le rôle des cellules saines, et les fibroblastes transformés représentent les cellules

cancéreuses. Les cellules saines et cancéreuses sont exposées aux mêmes concentrations de médicaments, ce qui reproduit la situation *in vivo* dans laquelle les tissus sains et tumoraux sont exposés aux mêmes concentrations sanguines.

Les stratégies thérapeutiques optimales sont définies comme celles qui maximisent le pourcentage de cellules tumorales tuées, sous la contrainte que le pourcentage de cellules saines tuées demeure au-dessus d'un seuil de tolérabilité.

## Étude des stratégies existantes en clinique

Nous explorons ici les combinaisons médicamenteuses existantes en clinique, en cas de résistance des cellules cancéreuses due à une surexpression des tyrosines kinases SRC, ou d'une défaillance de la machinerie apoptotique. Nous avons, tout d'abord, étudié mathématiquement l'administration de staurosporine, après une exposition à l'herbimycine, un inhibiteur des tyrosines kinases SRC. Nous avons supposé une exposition à l'herbimycine suffisamment longtemps avant l'administration de la staurosporine de sorte que les cellules soient à l'équilibre au moment de celle-ci. L'activité de l'herbimycine est alors modélisée par une diminution du paramètre  $V_p$  de 98% de sa valeur d'origine.

Sous toutes ces hypothèses, le modèle mathématique prédit que cette combinaison de médicaments annihile la résistance de la population tumorale dans laquelle 99% des cellules sont apoptotiques après 8 h d'exposition à la staurosporine. Ce comportement du modèle est cohérent avec les données expérimentales qui montrent que 98% de cellules v-src sont apoptotiques après exposition aux médicaments (Figure 4.7, [114]).

Nous avons ensuite étudié la combinaison de la staurosporine avec l'ABT-737, un inhibiteur compétitif des protéines anti-apoptotiques. Comme pour l'herbimycine, nous supposons que l'ABT-737 est administré suffisamment longtemps avant l'exposition à la staurosporine pour que les cellules soient à l'état d'équilibre au moment de celle-ci. La préincubation des cellules avec de l'ABT-737 a été modélisée par une diminution de la concentration totale de BCL2, proportionnelle à la concentration d'ABT-737. Conformément aux résultats expérimentaux, nous supposons que l'ABT-737 seul n'induit pas d'apoptose ([114]).

Nous avons recherché la concentration optimale d'ABT-737 qui maximise l'apoptose dans les cellules cancéreuses, sous la contrainte que le pourcentage de cellules apoptotiques dans la population saine n'excède pas un seuil de toxicité. Pour des valeurs de ce seuil comprises entre 0 et 80% de cellules apoptotiques, les concentrations optimales d'ABT-737 calculées par les procédures d'optimisation sont toutes égales approximativement à zéro. Cela signifie que l'ABT-737 ne devrait pas être utilisé en combinaison avec un agent cytotoxique dans notre système biologique. En effet, la quantité totale de BCL2 est plus importante dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses (Figure 4.1) et inhiber cette protéine revient à annihiler un avantage de survie des cellules saines.

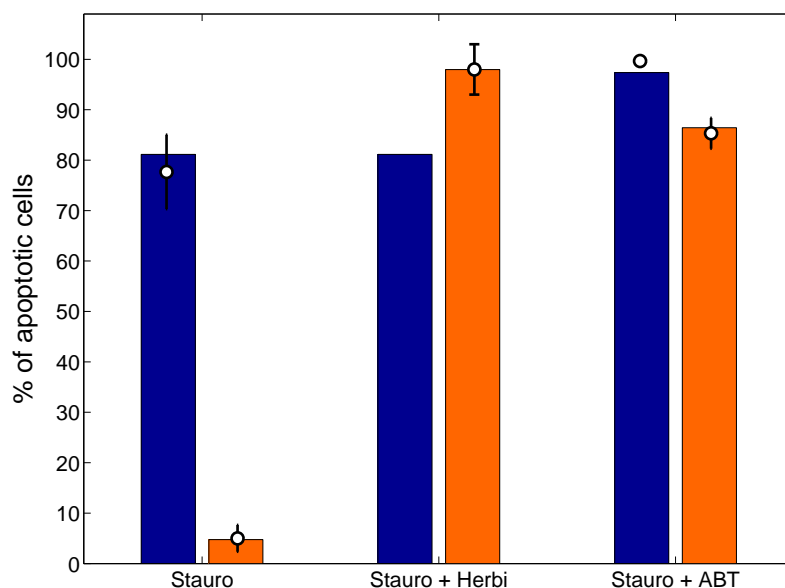


FIG. 4.7: **Pourcentage de cellules apoptotiques dans les fibroblastes normaux (bleu) et transformés v-src (orange)** Les points sont les mesures expérimentales de [114] pour une exposition à la staurosporine administrée seule, ou combinée à l'herbimicine, et des données originales pour l'exposition à la staurosporine combinée à l'ABT-737. Les barres sont les résultats de simulations du modèle mathématique de l'apoptose par voie mitochondriale, calibré aux données par la méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5).

Pour confirmer expérimentalement cette prédiction du modèle, nous avons pré-incubé les cellules normales et v-src avec de l'ABT-737 avant l'exposition à la staurosporine. L'efficacité sur les fibroblastes transformés a été augmentée, par rapport à une administration de staurosporine seule, mais est restée inférieure à la toxicité (Figure 4.7). De plus, comme anticipé par le modèle, cette combinaison médicamenteuse aboutit à une toxicité extrêmement haute dans les cellules parentales avec 99% de cellules apoptotiques.

### Stratégies thérapeutiques théoriquement optimales

Nous avons ensuite entrepris la détermination de stratégies thérapeutiques théoriquement optimales. Les combinaisons médicamenteuses considérées consiste en une administration de staurosporine après exposition des cellules à des inhibiteurs des tyrosines kinases SRC, ou/et des activateurs ou répresseurs de l'expression des protéines de la famille BCL2. Comme précédemment, nous considérons une exposition avant l'administration de l'agent antitumoral afin que l'équilibre du système biologique soit atteint au moment de celle-ci.

L'inhibiteur de SRC est modélisé par la diminution du paramètre  $V_p$  de 98% de sa valeur initiale. L'effet des activateurs et répresseurs des protéines de l'apoptose mitochondriale est représenté par l'addition d'un facteur à  $BAX_{tot}$ ,  $BCL2_{tot}$  et  $BID_{tot}$ . Ce facteur est recherché dans les intervalles  $[-BAX_{tot\_normal} \ 500]$ ,  $[-BCL2_{tot\_cancer} \ 500]$ , et  $[-BID_{tot\_cancer} \ 500]$  respectivement. Le même facteur est appliqué simultanément aux quantités totales dans les cellules normales et cancéreuses.

Nous avons recherché la stratégie optimale qui maximise l'efficacité dans les cellules cancéreuses, sous la contrainte que moins d'1% des cellules saines soient apoptotiques après 8 h d'exposition à la staurosporine.

La combinaison médicamenteuse théoriquement optimale, calculée par les procédures d'optimisation, consiste en l'administration de la staurosporine après exposition à des inhibiteurs de SRC, des répresseurs de BAX et BCL2, et un activateur de  $BH3_a$ . Le répresseur de BAX est administré de sorte que la concentration totale de BAX dans les cellules normales soit en-dessous du seuil apoptotique imposé sur  $[BAX_{oligo}]$ , ce qui empêche tout phénomène d'apoptose dans notre modèle. Comme la quantité de BAX est plus importante dans les cellules cancéreuses, elle reste au-dessus du seuil apoptotique. Une fois que les cellules saines sont ainsi protégées de l'apoptose, la quantité de BCL2 peut être réduite, et celle de  $BH3_a$  augmentée, sans risquer une toxicité sévère. Comme attendu, la stratégie optimale inclut la pré-incubation des cellules avec un inhibiteur de SRC pour annihiler la phosphorylation de BIK sous le contrôle de SRC dans les cellules cancéreuses.

Numériquement, la stratégie optimale consiste à diminuer  $BAX_{tot}$  de 97  $\mu\text{M}$ ,  $BCL2_{tot}$  de 88  $\mu\text{M}$ , et à augmenter  $BID_{tot}$  de 500  $\mu\text{M}$ . Cette combinaison médicamenteuse aboutit à 99% de cellules apoptotiques dans les cellules cancéreuses et moins de 1% dans la population saine (Figure 4.8).

Cette stratégie thérapeutique théoriquement optimale implique l'administration d'un médicament cytotoxique combinée à quatre autres agents, ce qui semble peu réaliste dans une perspective d'application clinique. Nous avons donc entrepris de classer hiérarchiquement les agents thérapeutiques considérés, afin de déterminer des combinaisons médicamenteuses optimales incluant un, deux ou trois médicaments administrés avant la staurosporine.

Les stratégies qui ont été retenues sont celles qui satisfont la contrainte de tolérabilité, fixée à environ 1% de cellules apoptotiques dans la population saine, et qui aboutissent à la même efficacité que la combinaison des 5 agents, c'est-à-dire environ 99% de cellules apoptotiques dans la population cancéreuse. Toutes les stratégies retenues incluent la répression de l'expression de BAX et l'exposition à un ou deux agents parmi un répresseur de BCL2, un activateur de  $BH3_a$  et un inhibiteur de SRC (Tableau 4.2). La seule diminution de la quantité de BAX satisfait la contrainte de tolérabilité mais a pour conséquence une efficacité de moins de 1% de cellules apoptotiques. Ainsi, les combinaisons médicamenteuses optimales qui impliquent le nombre minimal d'agents thérapeutiques consiste en l'administration de la staurosporine après exposition à un répresseur de BAX, et soit un répresseur de BCL2, soit un inhibiteur de SRC.

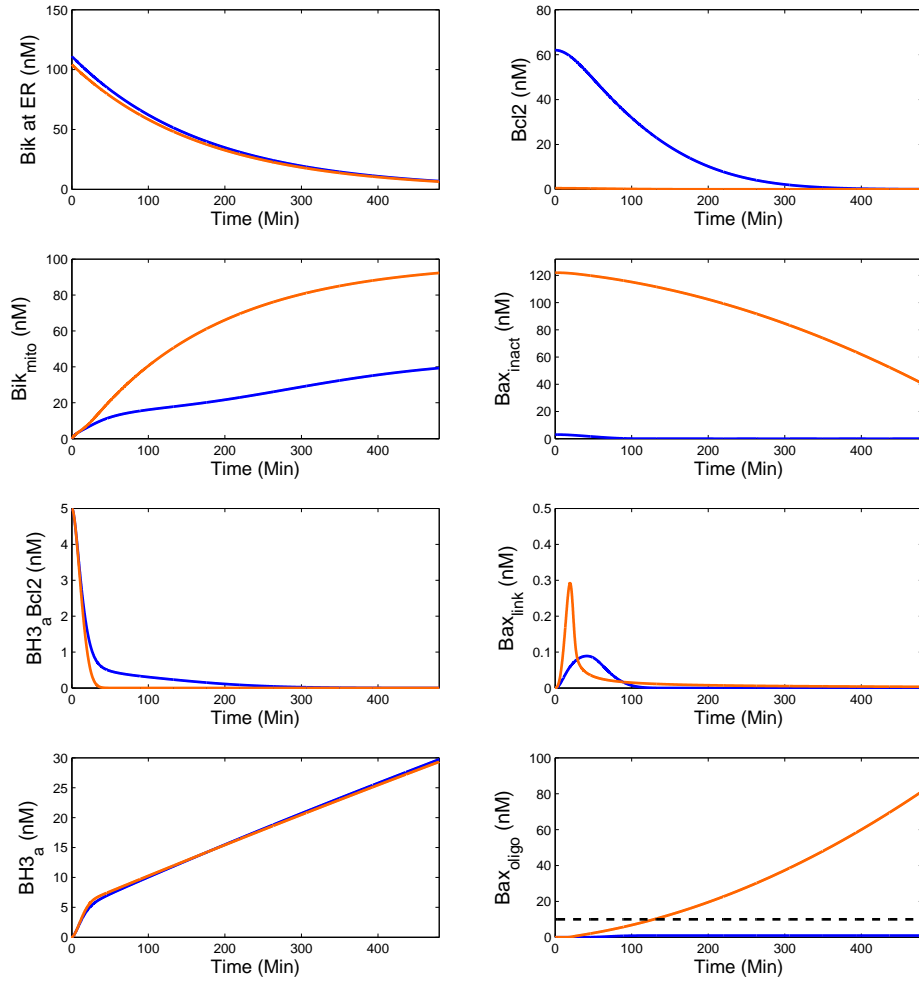


FIG. 4.8: **Simulation de la réponse des cellules normales (bleu) et cancéreuses (orange) à la stratégie théoriquement optimale.** La stratégie optimale consiste en l'administration de la staurosporine après exposition à quatre agents : un inhibiteur de SRC qui annihile la phosphorylation de BIK dans les cellules cancéreuses, un répresseur de BAX administré de sorte que la concentration de BAX dans les cellules normales soit en-dessous du seuil apoptotique, un répresseur de BCL2, et un activateur de  $BH3_a$ . Cette combinaison médicamenteuse aboutit à une valeur de  $BAX_{oligo}$  qui reste sous le seuil d'apoptose dans les cellules saines, et qui le dépasse dans les cellules cancéreuses.

	Cellules saines (% de cellules apoptotiques)	Cellules cancéreuses (% de cellules apoptotiques)
1 agent		
BAX	1.67	0.003
BCL2	99.5	99.5
$BH3_a$	99.7	75.1
SRC	88.8	98.9
2 agents		
BAX/BCL2	0.45	99.5
BAX/ $BH3_a$	2.56	74.63
BAX/SRC	1.67	98.97
BCL2/ $BH3_a$	99.9	99.9
BCL2/SRC	99.5	99.8
$BH3_a$ /SRC	99.76	99.94
3 agents		
BAX/BCL2/ $BH3_a$	0.43	99.96
BAX/BCL2/SRC	0.45	99.8
BAX/ $BH3_a$ /SRC	2.5e-5	99.94
BCL2/ $BH3_a$ /SRC	99.96	99.98
4 agents		
BAX/BCL2/ $BH3_a$ /SRC	0.43	99.98

**TAB. 4.2: Simulations de la toxicité et de l'efficacité d'une exposition de 8 h à la staurosporine, après administration des différentes combinaisons médicamenteuses** Les stratégies thérapeutiques étudiées consiste en l'administration de staurosporine, précédée d'une exposition aux agents indiqués dans la première colonne. BAX= répresseur de BAX, BCL2 = répresseur de BCL2,  $BH3_a$  = activateur de  $BH3_a$ , SRC = inhibiteur de SRC. Les valeurs exposées sont celles de  $n(t)$  après 8 h d'exposition à la staurosporine, dans les cellules normales et cancéreuses. Les lignes en bleu sont les stratégies qui aboutissent à une efficacité d'environ 99%, et d'une toxicité inférieure à environ 1%

## 4.4 Discussion et conclusion

Une approche combinée mathématique et expérimentale a été menée pour étudier l'apoptose par voie mitochondriale dans les fibroblastes de souris NIH-3T3 normaux et transformés v-src. Un modèle mathématique de la cinétique de la protéine pro-apoptotique BIK en conditions normales a été construit et calibré aux données expérimentales. Les valeurs de paramètres obtenues confirment que la phosphorylation de BIK sous le contrôle de la tyrosine kinase SRC est inactive dans les cellules normales. Après le signal apoptotique que constitue une exposition à la staurosporine, une relocalisation de BIK aux mitochondries a été démontrée, la concentration totale de la protéine restant constante durant le stress.

Nous avons ensuite conçu un modèle mathématique de la voie mitochondriale de l'apoptose qui a été calibré aux données expérimentales et utilisé pour la détermination de stratégies thérapeutiques optimales. Le modèle aboutit à des résultats théoriques cohérents avec le fait expérimentalement démontré que la préincubation des cellules v-src avec un inhibiteur des tyrosines kinases SRC, avant l'exposition à la staurosporine, annihile la résistance des fibroblastes transformés. Le modèle prédit que l'administration de l'ABT-737 avant l'exposition à la staurosporine ne devrait pas être entreprise dans notre système biologique, ce qui a été expérimentalement corroboré. Enfin, la stratégie thérapeutique théoriquement optimale consiste en une exposition à la staurosporine, après une administration d'un répresseur de l'expression de BAX (de manière à diminuer sa concentration en-dessous du seuil apoptotique dans les cellules normales, mais pas dans les cellules cancéreuses), combinée à un répresseur de BCL2 ou un inhibiteur de tyrosines kinases SRC.

Plusieurs études publiées présentent des travaux de modélisation de l'apoptose. Certains modèles représentent toutes les voies de l'apoptose, depuis le stress apoptotique, jusqu'à la mort cellulaire ([151, 152, 153]). Une modélisation moléculaire de la voie mitochondriale de l'apoptose a été proposé dans quatre études ([154, 155, 156, 157]). Ces modèles ont été conçu pour répondre à des problématiques différentes de la nôtre. Cela nous a donc conduit à en construire un nouveau ayant pour but annoncé l'optimisation thérapeutique dans le cas précis des fibroblastes NIH-3T3 transformés v-src ou non.

Notre modèle mathématique de l'apoptose par voie mitochondriale simule les événements moléculaires depuis le signal de mort jusqu'à la libération du cytochrome C dans le cytoplasme. La présence du cytochrome c dans le cytoplasme est expérimentalement corrélé avec le déclenchement de l'apoptose. Cependant, d'autres protéines, en aval du relargage du cytochrome C par les mitochondries, telles que les caspases, ou les protéines inhibitrices de l'apoptose liées au chromosome X (XIAP), pourrait influencer le comportement apoptotique des cellules. Dans le cas des fibroblastes NIH-3T3, une forte corrélation a été expérimentalement démontré entre la relâche du cytochrome C dans le cytoplasme et la mort cellulaire par apoptose ([114]).

Nous avons supposé dans notre modélisation que les quantités totales de BAX et BCL2 restaient inchangées au cours de l'apoptose. Cependant, le stress apoptotique

pourrait entraîner une augmentation de la transcription de BAX, et une diminution de celle de BCL2, possiblement par l'activation de la protéine p53 ([147]). De plus, nous avons considéré que  $[BCL2]$  n'interagissait qu'avec  $[BAX_{link}]$ , alors qu'il pourrait être capable de s'associer aux molécules de BAX oligomérisées qui terminent la chaîne d'oligomérisation ([148]).

Les interactions entre BCL2 et BIK situé dans le RE ont été négligées dans notre modèle mathématique. Cependant, BIK pourrait être séquestré par des protéines anti-apoptotiques en conditions normales ([149, 150]). Une modification post-traductionnelle pourrait alors libérer les protéines BIK au moment du signal apoptotique. Ce mécanisme moléculaire est indirectement pris en compte dans notre modèle, en considérant que le paramètre  $k_{locBIK}$  représente à la fois cette libération et la migration spatiale des protéines BIK vers les mitochondries.



## Chapitre 5

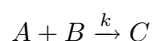
# Les Outils Mathématiques

Nous présentons dans ce chapitre les outils mathématiques utilisés pour les projets de recherche exposés dans cette thèse.

### 5.1 Modélisation de réactions biochimiques

#### 5.1.1 Loi d'action de masse

Le changement au cours du temps des concentrations d'espèces chimiques subissant des réactions spontanées peut être modélisé par la loi d'action de masse ([158]). Soit A et B deux réactifs qui interagissent pour donner le produit C :



La vitesse d'accumulation du produit  $\frac{d[C]}{dt}$  dépend de la concentration des deux réactifs, de leur affinité l'un pour l'autre (variant selon la forme géométrique et la taille des molécules), et des conditions expérimentales (température, disposition spatiale du système). La loi d'action de masse s'écrit ainsi :

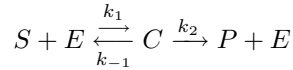
$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B]$$

où  $k$  est la constante de réaction et prend en compte l'affinité entre A et B, et la variabilité due aux conditions expérimentales. La loi d'action de masse suppose donc que la vitesse de réaction est proportionnelle aux concentrations des réactants.

La loi d'action de masse n'est cependant pas valable dans toutes les situations. Par exemple, pour de fortes concentrations, doubler les concentrations n'entraînera pas forcément un doublement de la vitesse de réaction qui pourra éventuellement saturer. De plus, pour de faibles concentrations, la représentation des concentrations en tant que variables continues peut ne pas être appropriée considérant le petit nombre de molécules. Une modélisation considérant les molécules individuellement pourrait s'avérer mieux adaptée. Nous référons à la section 1.1 de [158] pour plus de détails.

### 5.1.2 La loi cinétique de Michaelis-Menten

Nous considérons ici les réactions chimiques catalysées par une enzyme. Les enzymes sont des catalyseurs qui aide la conversion des réactants en produits mais ne sont pas changées par la réaction. Elles accélèrent la réaction pour laquelle elles sont spécifiques. Michaelis et Menten proposent en 1913 un modèle mathématique expliquant la cinétique des réactions enzymatiques ([158]). Dans leur schéma de réaction, l'enzyme E convertit le substrat S en le produit P à travers deux étapes. E se lie à S pour former un complexe C, puis C se dissocie et produit P, libérant ainsi E :



En appliquant la loi d'action de masse à ses mécanismes, nous obtenons les quatre équations différentielles suivantes :

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}C - k_1SE \quad (5.1)$$

$$\frac{dE}{dt} = (k_{-1} + k_2)C - k_1SE \quad (5.2)$$

$$\frac{dC}{dt} = -(k_{-1} + k_2)C + k_1SE \quad (5.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2C \quad (5.4)$$

La loi de conservation  $\frac{dE}{dt} + \frac{dC}{dt} = 0$  donne  $E + C = E_0$  où  $E_0$  est la quantité totale d'enzyme disponible.

#### L'approximation d'équilibre

L'hypothèse initialement proposée par Michaelis et Menten consiste à dire que le substrat S est en équilibre instantané avec le complexe C, ou mathématiquement, que  $k_1$  et  $k_{-1}$  sont largement supérieurs à  $k_2$ . Ainsi,  $k_1SE = k_{-1}C$ . Comme  $E = E_0 - C$ , nous en déduisons :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2E_0S}{k_{-1}/k_1 + S} = \frac{V_{max}S}{K_s + S} \quad (5.5)$$

où  $K_s = k_{-1}/k_1$  et  $V_{max} = k_2E_0$ .

$V_{max}$  est la vitesse maximale de la réaction. Elle est atteinte lorsque la totalité des molécules d'enzyme sont en complexe avec le substrat. Lorsque  $S = K_s$ , la vitesse de la réaction vaut la moitié de son maximum.

Pour de petites concentrations de substrat (i.e.  $K_s \gg S$ ), la cinétique de la réaction est linéaire, d'un coefficient directeur proportionnel à la quantité totale d'enzyme  $E_0$ . Pour de grandes concentrations (i.e.  $K_s \ll S$ ), la vitesse de réaction sature à  $V_{max}$  et dépend donc de la quantité totale d'enzyme  $E_0$  et du taux de dissociation du complexe C,  $k_2$ . C'est pour cette raison que la réaction de dissociation  $C \xrightarrow{k_2} P + E$  est appelée réaction limitante.

## L'approximation de quasi-stationnarité

Une analyse alternative est proposée par Briggs et Haldane en 1925. Elle est à la base des travaux actuels de modélisation des réactions enzymatiques. Briggs et Haldane supposent que les taux de formation et de dissociation des complexes C sont sensiblement égaux en tout temps et donc que :  $\frac{dC}{dt} \approx 0$ . Nous renvoyons aux références [159] et [158] pour le détail des calculs qui aboutissent au résultat suivant :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2 E_0 S}{k_{-1}/k_1 + S} = \frac{V_{max} S}{K_m + S} \quad (5.6)$$

où  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ .

Il est à remarquer que lorsque  $k_{-1}$  est largement supérieur à  $k_2$ , ce qui est supposé par l'approximation d'équilibre, nous obtenons  $K_s \approx K_m$ . Nous référons à la section 1.2 de [158] pour plus de détails sur la cinétique des réactions enzymatiques.

### 5.1.3 Modéliser la diffusion passive à travers une membrane

Nous présentons ici une modélisation de la diffusion d'une espèce chimique C à travers la membrane d'une cellule. Considérons tout d'abord uniquement la diffusion du milieu extracellulaire vers milieu intracellulaire. La vitesse de diffusion de l'espèce chimique C vers le cytoplasme de la cellule dépend de : a) la concentration extérieure  $C_{out}$ , b) la perméabilité membranaire de la cellule  $P$ , et c) la surface de contact  $S$  entre le milieu extracellulaire et la cellule. Ainsi la quantité de matière qui pénètre à l'intérieur de la cellule  $n_{in}$  suit la loi cinétique suivante :

$$\frac{dn_{in}}{dt} = P S C_{out}$$

ou

$$\frac{dC_{in}}{dt} = P \frac{S}{V_{in}} C_{out} \quad (5.7)$$

où  $C_{in}$  est la concentration intracellulaire de C et  $V_{in}$  le volume intracellulaire.

Pour déterminer le terme correspondant de diffusion pour l'équation de la concentration extracellulaire  $C_{out}$ , on utilise la loi de conservation de la masse :  $\frac{d(V_{in}C_{in} + V_{out}C_{out})}{dt} = 0$ . Si  $V_{in}$  et  $V_{out}$  sont constants, cela donne immédiatement :

$$\frac{dC_{out}}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -P \frac{S}{V_{in}} C_{out} \quad (5.8)$$

Considérons désormais les deux sens de diffusion à travers la membrane cellulaire. Les équations s'écrivent alors :

$$\frac{dC_{in}}{dt} = P \frac{S}{V_{in}} (C_{out} - C_{in}) \quad (5.9)$$

$$\frac{dC_{out}}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -P \frac{S}{V_{in}} (C_{out} - C_{in}) \quad (5.10)$$

Une manière de simplifier l'équation ci-dessus consiste à supposer la surface de contact  $S$  proportionnelle au volume intracellulaire  $V_{in}$ , par un facteur  $R$ . Les équations deviennent alors :

$$\begin{aligned}\frac{dC_{in}}{dt} &= PR(C_{out} - C_{in}) \\ \frac{dC_{out}}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} &= -PR(C_{out} - C_{in})\end{aligned}$$

On remarque que l'équation de la concentration intracellulaire ne dépend plus de  $S$  ni de  $V_{in}$ , ce qui peut s'avérer utile dans le cas où ces quantités varient. Nous référons à [160] pour plus de détails.

## 5.2 La formule du cosinor

La formule dite du Cosinor est fréquemment utilisée pour modéliser les rythmes biologiques (Figure 5.1, [161]). Elle se présente comme suit :

$$Y(t) = M + A \cos\left(\frac{2\pi}{T}(t - \phi)\right)$$

où

- $t$  représente le temps,
- $T$  est la période,
- $M$  est le mésoir, c'est-à-dire la valeur moyenne du signal sur une période,
- $A$  est l'amplitude,
- $\phi$  est l'acrophase, c'est-à-dire l'heure à laquelle le signal atteint son maximum.

Cette formule nécessite la connaissance *a priori* de la période du rythme. Une analyse spectrale par transformation de Fourier discrète (FTT, Fast Fourier Discret) peut être réalisée pour identifier la période fondamentale et ses harmoniques éventuelles ([162]).

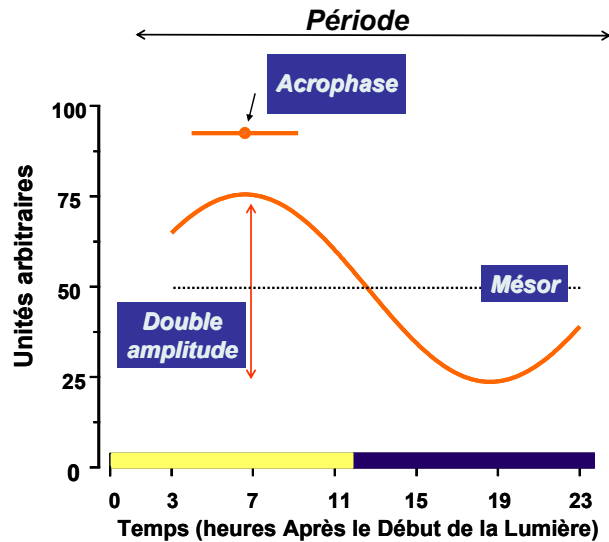


FIG. 5.1: La formule du cosinor

## 5.3 Estimation de paramètres

Nous présentons dans cette partie les méthodes utilisées pour estimer les paramètres de nos modèles mathématiques.

### 5.3.1 La méthode des moindres carrés

La méthode des moindres carrés, indépendamment élaborée par Legendre en 1805 et Gauss en 1809, permet de comparer des données expérimentales, à un modèle mathématique censé décrire ces données. Dans le cas le plus courant, le modèle théorique est une famille de fonctions  $f(x, \theta)$  d'une ou plusieurs variables  $x$ , indexées par un ou plusieurs paramètres  $\theta$  inconnus. La méthode des moindres carrés permet de sélectionner les valeurs de paramètres pour lesquelles la fonction  $f(x, \theta)$  reproduit le mieux les données expérimentales.

Supposons que nous disposons de  $N$  mesures  $(y_i)_{i=1, \dots, N}$  réalisées aux valeurs  $(x_i)$  de la variable  $x$ , les paramètres  $\theta$  "optimaux" au sens de la méthode des moindres carrés sont ceux qui minimisent la quantité :

$$S(\theta) = \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; \theta))^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2(\theta)$$

où les  $r_i(\theta)$  sont les résidus au modèle, i.e. les écarts entre les points de mesure  $y_i$  et le modèle  $f(x_i; \theta)$ .  $S(\theta)$  peut être considéré comme une mesure de la distance entre les données expérimentales et le modèle théorique qui prédit ces données.

La minimisation de cette distance a été effectuée par des algorithmes d'optimisation présentés à la section 5.5.

### 5.3.2 Améliorer la méthode des moindres carrés par la technique du bootstrap.

Nous avons utilisé une méthode de bootstrap pour tenir compte des écarts types des points de données expérimentaux ([163]). Les données considérées ici prennent la forme suivante : pour chaque point de temps  $t_i$ ,  $i = 1, \dots, N$ , nous disposons de  $P$  mesures expérimentales que l'on note  $z_j$ ,  $j = 1, \dots, P$ . La méthode de bootstrap que nous avons utilisée comporte trois étapes :

1. Nous générons un nombre  $K$  de données expérimentales "fictives" à partir des résultats expérimentaux. Soient  $z_j$ ,  $j = 1, \dots, P$  les  $P$  mesures expérimentales disponibles pour le point de temps  $t_i$ ,  $i = 1, \dots, N$ , leur moyenne  $m_i$  et écart-types  $\sigma_i$  sont calculés comme suit :

$$m_i = \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P z_j \text{ et } \sigma_i = \sqrt{\frac{1}{P-1} \sum_{j=1}^P (z_j - m_i)^2}$$

Nous supposons que chaque point de données suit une loi normale de valeur moyenne et écarts types ceux calculés ci-dessus. Nous générons alors aléatoirement suivant cette loi  $K$  valeurs pour ce point de données. Cette étape est répétée pour chaque point de données. Nous obtenons alors  $K$  ensembles de données "fictives".

2. Pour chaque ensemble de données calculé à l'étape précédente, nous utilisons la méthode des moindres carrés pour déterminer les paramètres optimaux du modèle mathématique qui permettent la meilleure reproduction de ces résultats expérimentaux "fictifs". Nous obtenons donc K ensembles de valeurs de paramètres.
3. Pour chaque paramètre du modèle, nous calculons sa moyenne et son écart-type, à partir des K valeurs obtenues à l'étape précédente.

L'écart-type ainsi calculé pour chaque paramètre mesure la fiabilité de l'estimation. Un grand écart-type signifie soit que les données expérimentales utilisées présentent une grande variabilité, soit qu'elles ne sont pas suffisantes pour déterminer une valeur précise, ce qui encouragera à entreprendre de nouvelles expérimentations visant à obtenir plus d'informations sur ce paramètre en particulier.

En pratique, la méthode des moindres carrés est utilisée en amont pour déterminer des valeurs vraisemblables de paramètres, qui serviront de valeurs initiales pour les estimations de l'étape 2 de la méthode de bootstrap.

## 5.4 Procédures d'optimisation sous contrôle

Les procédures d'optimisation thérapeutique ont consisté à minimiser une fonction coût, en fonction des paramètres du traitement (doses des médicaments, durée et CT d'exposition). Les algorithmes mis en oeuvre pour la tâche de minimisation sont présentés à la section 5.5. Nous décrivons ici les fonctions coût que nous avons utilisées.

### Optimisation sans contrainte de toxicité

Dans le cas où nous considérons une unique population de cellules cancéreuses, notre but est de maximiser l'efficacité du traitement, évaluée à la fin de l'exposition médicamenteuse. La fonction coût à minimiser est donc égale à l'opposé de cette efficacité au temps final.

Pour le modèle de la PK-PD du CPT11, l'efficacité est mesurée par la variable mathématique  $I_{compl}$  qui représente les dommages à l'ADN induits par le traitement. La fonction coût est donc :

$$f_{cout}(p) = -I_{compl}(t_{final}, p)$$

où  $p$  sont les paramètres du traitement dont les valeurs optimales sont à déterminer.

Pour le modèle de l'apoptose par voie mitochondriale, la variable  $n(t)$  représente les cellules survivantes et la fonction coût est donc égale à :

$$f_{cout}(q) = n(t_{final}, q)$$

où  $q$  sont les paramètres du traitement à déterminer.

## Optimisation avec contrainte de toxicité

Pour tenir compte des toxicités limitantes dans la procédure d'optimisation thérapeutique, nous considérons une seconde population de cellules, qui représentent les cellules saines. Nous prenons maintenant en compte une contrainte sous la forme d'un seuil que la toxicité ne doit pas dépasser. La stratégie thérapeutique consiste donc désormais en la maximisation de l'efficacité pour les cellules cancéreuses, sous une contrainte de tolérabilité.

Mathématiquement, nous ajoutons aux fonctions coût décrites ci-dessus un terme qui vaut zéro si la contrainte est respectée, et qui prend une grande valeur si la contrainte ne l'est pas. L'algorithme d'optimisation cherche à minimiser la fonction coût et va donc éliminer les valeurs de paramètres du traitement qui rendent le terme de la contrainte différent de zéro.

Pour le modèle de la PK-PD du CPT11, nous notons  $Icompl_{cancer}$  les dommages à l'ADN dans la population tumorale et  $Icompl_{sain}$  ceux dans les cellules saines. La fonction coût devient :

$$f_{cout}(p) = -Icompl_{cancer}(t_{final}, p) + contrainte(p)$$

où  $contrainte(p)$  vaut zéro si  $Icompl_{sain}(t_{final}, p)$  est inférieur au seuil de toxicité  $th_{tox}$ , et 1000 sinon.

Pour le modèle de l'apoptose par voie mitochondriale, nous notons  $n_{cancer}$  le pourcentage de cellules survivantes dans la population cancéreuse, et  $n_{sain}$  celui dans la population saine. La fonction coût devient :

$$f_{cout}(q) = n_{cancer}(t_{final}, q) + contrainte(q)$$

où  $contrainte(q)$  vaut zéro si  $n_{sain}(t_{final}, q)$  est supérieur au seuil de toxicité  $th_{tox}$ , et 1000 sinon. La valeur de 1000 a été choisie puisqu'elle est beaucoup plus grande que la variable  $Icompl$  typiquement de l'ordre de  $10^{-3}$ , et que la variable  $n$  qui n'excède pas  $10^2$ .

La tâche de minimisation des fonctions coût a ensuite été réalisée par les algorithmes *fmincon* et CMAES présentés dans la partie suivante.

## 5.5 Les algorithmes de minimisation

### fmincon

La fonction *fmincon* de Matlab permet de résoudre les problèmes d'optimisation non linéaire sous contraintes. Elle utilise l'algorithme de quasi-Newton BFGS (Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno), pour le calcul du minimum d'une fonction  $f(x_1, \dots, x_n)$  en utilisant son gradient ( $G_i = \frac{\delta f}{\delta x_i}$ ,  $i = 1, \dots, n$ ) et sa matrice hessienne ( $H_{i,j} = \frac{\delta^2 f}{\delta x_i \delta x_j}$ ,  $i, j = 1, \dots, n$ ) ([164]).

L'idée principale de cette méthode est d'éviter de construire explicitement la matrice hessienne et de construire à la place une approximation de la dérivée seconde de la fonction à minimiser, en analysant les différents gradients successifs. Cette approximation des dérivées de la fonction permet ensuite l'application de la méthode de Quasi-Newton de manière à trouver le minimum dans l'espace des paramètres ([165]).

## CMA-ES

L'algorithme CMA-ES (Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy) est un algorithme évolutionniste pour des problèmes d'optimisation non linéaire et non convexe dans des domaines continus ([166]). CMA-ES est typiquement utilisé pour résoudre des problèmes non contraints, ou comportant uniquement des contraintes d'intervalles sur les paramètres à optimiser. Le nombre de ces paramètres peut être compris entre 3 et 100.

L'utilisation de cet algorithme est recommandée lorsque les méthodes basées sur le calcul de dérivée, telles que le gradient conjugué ou la méthode de quasi-Newton BFGS, ne réussissent pas à accomplir la tâche de minimisation à cause d'un domaine de recherche irrégulier (discontinuités, minima locaux, bruit). Si les méthodes basées sur la dérivée sont capables de résoudre le problème, elles sont en général plus rapide que l'algorithme CMA-ES d'un facteur pouvant aller jusqu'à 30 pour les fonctions coût les plus simples.

Dans notre étude, nous avons donc utilisé l'algorithme *fmincon* pour les optimisations sans contrainte de toxicité, en fixant des intervalles de recherche pour les valeurs des paramètres. L'algorithme CMA-ES a été utilisé pour l'optimisation des fonctions coût incluant une contrainte de tolérabilité, parce qu'elles présentent une discontinuité importante que la fonction *fmincon* n'a pas su gérer en pratique.



## Chapitre 6

# Matériel et Méthodes expérimentales

### 6.1 Étude de la PK-PD du CPT11 sur cellules Caco-2

#### 6.1.1 Médicaments

La solution mère de CPT11 provient de Pfizer (Paris, France). Elle a été ajoutée au milieu de culture 16 h avant l'exposition des cellules, dans le but d'atteindre l'équilibre lactone-carboxylate (cf. section 2.8). L'inhibiteur non spécifique de transporteurs ABC, le verapamil, provient de Sigma Aldrich (Paris, France).

#### 6.1.2 Culture de cellules Caco-2

La lignée de cellules Caco-2 a été obtenue de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD). Les cellules sont cultivées dans un milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) : Ham F12 (1 :1), additionné de pénicilline (100 U/L), streptomycine (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), glutamine (2 mM) (Fischer Scientific, Paris, France) et contenant 10% de sérum de veau foetal (FBS) (Dutscher, Paris, France). Elles sont maintenues à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Le milieu de culture a été renouvelé tous les trois jours.

Pour les études de pharmacocinétique et de quantification d'ARN, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Petri à 2000 cellules / $\text{cm}^2$ . Pour les mesures de viabilité et d'apoptose, elles sontensemencées dans des plaques de 96 puits à 8000 cellules par puits.

Les cellules Caco-2 sont synchronisées, 3 jours après l'obtention de la confluence, par un choc de sérum (milieu de culture standard contenant 50% de FBS) durant deux heures, puis replacées dans les conditions de cultures habituelles.

Le volume moyen intracellulaire est déterminé à partir de photographies du champ du microscope, après évaluation du diamètre d'une dizaine de cellules.

### 6.1.3 Quantification des ARN par RT-qPCR

L'expression génique des protéines d'intérêt est quantifiée par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR). Les cellules Caco-2 sont récupérées et lysées dans de l'isothiocyanate guanosine, puis congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les ARN totaux sont extraits comme décrit dans [167]. La transcription inverse est réalisée avec le Superscript II RT- (Invitrogen, Paris, France). La PCR quantitative est effectuée avec le LightCycler 480, en utilisant le kit LightCycler 480 SYBR Green I master (Roche, Meylan, France). La quantification relative des ARN étudiés est réalisée, en utilisant le gène *36B4* comme référence, par le logiciel Relquant (Roche, Meylan, France).

Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de l'horloge *Rev-erba*, *Per2*, et *Bmal1* et du gène de référence *36B4* ont été précédemment décrites ([99]). Les amorces sont pour *ABCB1* : sense (CCACAGAGGGGATGGTCAGT), antisense (TAGGCATTGGCTTCCTTGAC) ; pour *ABCC1* : sense (ACCATCCACGACCC-TAATCC), antisense (GACTTGTTCCGACGTGTCCT) ; pour *ABCC2* : sense (ACCTAGGCACATGGCTCCTG), antisense (CAGGATCTGGAATCCGTAGG) ; pour *ABCG2* : sense (CCCAGTGTCAACAAGGAAACA), antisense (ACGAAGATTTGCCTC-CACCT) ; pour *UGT1A1* : sense (TCCCAGGAATTTGAAGCCTA), antisense (GT-GATAAAGGCACGGGTCAT) ; pour *TOP1* : sense (CCAAGCATAGCAACAGT-GAAC), antisense (GAGGCTCGAACCTTTTCCTC) ; et pour *CES2* : sense (GT-TAACGCTGCTGATGTTGC), antisense (GGTGGCCTGATGTTCTTGAG). La température d'hybridation pour toutes les amorces est de  $60^{\circ}\text{C}$ .

### 6.1.4 Chromatographie à phase liquide haute performance

L'évaluation des concentrations extra et intracellulaires de CPT11 et SN38 est réalisée par chromatographie à phase liquide haute performance (HPLC). Pour chaque boîte de culture, le milieu extracellulaire est transféré dans un tube qui sera conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son analyse. Les cellules sont rincées avec du tampon phosphate salin (PBS), qui est ensuite éliminé. Les cellules sont ensuite prélevées dans 1 mL de PBS. On les transfère ensuite dans un tube, que l'on centrifuge (5 min, 1500 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau stérile froide. Puis 200  $\mu\text{L}$  de solution d'acétonitrile/méthanol/acide chlorhydrique (50/50/1%) sont ajoutés. On mélange 45 sec avant de centrifuger (10 min, 1000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est récupéré et conservé dans un tube à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son analyse.

Les échantillons extracellulaires sont dilués au dixième dans du milieu de culture. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile acidifié 1% (acide trifluoroacétique) est ajouté. Les échantillons sont ensuite mélangés et centrifugés (5 min, 10 000 rpm). Les surnageants sont alors prélevés et transférés dans des flacons d'injection. Pour les échantillons intracellulaires, un volume de 30  $\mu\text{L}$  d'eau est rajouté à 70  $\mu\text{L}$  d'échantillon. La mixture est ensuite agitée, puis 85  $\mu\text{L}$  sont prélevés et transférés dans des flacons d'injection.

La méthode analytique mise au point, a permis la séparation et la quantification simultanée du CPT-11 et du SN-38. Les analyses chromatographiques sont réalisées

sur une chaîne de chromatographie liquide Dionex (Dionex corporation, Sunnyvale, CA). Elle est composée d'une pompe P680, d'un passeur automatique ASI-100, d'un four à colonne TCC-100 et d'un fluorimètre RF-2000. La chaîne est pilotée par le logiciel Chroméleon. La colonne analytique utilisée est une colonne nucleosil C18 (50 x 3mm, Interchim, Montluçon, France) protégée par une précolonne, de même phase (10 x 2,0 mm, 2 $\mu$ m, Interchim, Montluçon, France). La phase mobile est composée d'un mélange eau, acétonitrile acidifié (5% d'acide trifluoroacétique), et méthanol (65/27/8). Elle est délivrée à un débit de 0,6 mL/min, à une pression d'environ 65 Bars. Les temps de rétention sont approximativement de 2,7 min pour le SN38 et de 9 min pour le CPT11. Ces deux substances sont détectées par fluorimétrie aux longueurs d'ondes d'émission 380 nm et d'excitation 532 nm.

Les pics sont quantifiés par référence à une courbe de calibration standard obtenue par l'analyse de concentrations connues de médicaments (CPT11 : 0.001-0.1 mg/mL, et SN38 : 5.10-5-5.10-2 mg/mL). Le logiciel utilisé est WinNonLin Pro v.4.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

La méthode analytique a été validée selon les recommandations présentées dans : " Food and Drug Administration (FDA), guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation ". La limite de quantification ou LLOQ (Lower Limit of Quantification) a été validée à 250 ng/ml pour le CPT11 et 2.5 ng/ml pour le SN38 ([168])

Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées à 1 million de cellules, comme décrit ci-après.

### Normalisation des concentrations à 1 million de cellules

La mesure de concentration brute obtenue de la méthode d'HPLC dépend de la quantité de cellules présente dans la boîte de Pétri. Une normalisation des résultats a donc été entreprise de manière à calculer les concentrations intracellulaires et extracellulaires que l'on aurait obtenues si le nombre de cellules dans toutes les boîtes de Pétri était de 1 million.

Pour cela, nous avons mesuré l'évolution temporelle du nombre de cellules par boîte pour chaque expérience. Des boîtes de contrôle après 2, 12, 24 et 42 h d'exposition au CPT11 ont été trypsinées, et la quantité de cellules qu'elles contenaient comptée à la cellule de Mallasez. Les nombres de cellules pour les points de temps auxquels il n'y a pas de boîte de contrôle ont été obtenus par interpolation linéaire.

Les calculs de normalisation se font avec les notations suivantes :

- $n$  est la quantité de moles de médicaments.
- $( )_{meas}$  représente les valeurs brutes mesurées par la méthode d'HPLC, exprimées en  $\mu$  M.
- $( )_{1M}$  représente les valeurs normalisées à 1 million de cellules, exprimées en  $\mu$  M.
- $N_c$  est le nombre de cellules par boîte de Pétri, exprimé en millions de cellules.

Pour la normalisation des concentrations intracellulaires, nous utilisons la règle de proportionnalité suivante :

$$(n_{in})_{1M} = \frac{(n_{in})_{meas}}{N_c}$$

Nous divisons par le volume intracellulaire  $V_{in}$  :

$$\begin{aligned} \frac{(n_{in})_{1M}}{V_{in}} &= \frac{1}{N_c} \frac{(n_{in})_{meas}}{V_{in}} \\ (C_{in})_{1M} &= \frac{(C_{in})_{meas}}{N_c} \end{aligned}$$

La formule utilisée est donc :  $(C_{in})_{1M} = \frac{(C_{in})_{meas}}{N_c}$

Pour la normalisation des concentrations extracellulaires, nous utilisons la loi de conservation de la quantité totale de médicament  $n_{tot}$  :

$$\begin{aligned} (n_{out})_{1M} &= n_{tot} - (n_{in})_{1M} \\ (n_{out})_{1M} &= n_{tot} - \frac{(n_{in})_{meas}}{N_c} \\ (n_{out})_{1M} &= n_{tot} - \frac{1}{N_c} (n_{tot} - (n_{out})_{meas}) \\ (n_{out})_{1M} &= \frac{N_c - 1}{N_c} n_{tot} - \frac{1}{N_c} (n_{out})_{meas} \end{aligned}$$

Nous divisons par le volume extracellulaire  $V_{out}$  :

$$\begin{aligned} \frac{(n_{out})_{1M}}{V_{out}} &= \frac{N_c - 1}{N_c} \frac{n_{tot}}{V_{out}} - \frac{1}{N_c} \frac{(n_{out})_{meas}}{V_{out}} \\ (C_{out})_{1M} &= \frac{N_c - 1}{N_c} C_{tot} - \frac{1}{N_c} (C_{out})_{meas} \end{aligned}$$

La formule utilisée est donc :  $(C_{out})_{1M} = \frac{N_c - 1}{N_c} C_{tot} - \frac{1}{N_c} (C_{out})_{meas}$

### 6.1.5 Dosage de l'activité Topoisomérase 1

La détection de l'activité de la TOP1 est réalisée à l'aide du kit In vivo link Topo1 (TopoGen, Biovalley). Les cellules sont rincées avec du PBS puis lysées dans 3 mL de tampon de lyse (sarkosyl 1%, Tris-HCl 10 mM pH = 7,5, EDTA 1 mM) permettant d'extraire l'ADN et de le protéger de la dégradation.

Dans le but de séparer les protéines libres des protéines liées à l'ADN, les extraits cellulaires sont déposés sur un gradient de chlorure de césium. Quatre solutions de chlorure de césium de densités différentes ( $d_A=1,82$ ,  $d_B=1,72$ ,  $d_C=1,50$  et  $d_D=1,37$ ) sont préparées et 2 mL de chaque sont déposés successivement dans un tube de façon à constituer un gradient discontinu. Le lysat cellulaire est déposé à la surface du gradient.

Les gradients réalisés précédemment sont ensuite centrifugés à 31000 rpm pendant 18 heures à 25°C. Après centrifugation, des fractions successives de 400 µL sont réalisées en commençant par les densités les plus faibles. Pour chaque fraction, une mesure de l'absorbance à 260 nm est réalisée pour localiser les fractions contenant les protéines libres et celles contenant l'ADN.

50µL de chaque fraction sont ensuite dilués dans 100 µL de tampon phosphate de sodium (phosphate de sodium 25 mM, pH = 6,5). Les 150µL de solutions obtenus sont déposés dans un puit de l'appareil à dot blot. Les protéines des différentes fractions déposées sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride) préalablement régénérée dans du méthanol, par l'application d'un vide d'air.

La membrane est alors incubée 2 h sous agitation à température ambiante dans une solution de TBST BSA 1%. L'incubation de l'anticorps primaire anti-TOP1 dilué au 1/2500<sup>me</sup> dans du TBST est réalisée à 4°C sous agitation pendant une nuit. Le lendemain matin, la membrane est rincée 3 fois 10 min dans une solution de TBST. Elle est incubée 2 heures sous agitation à température ambiante avec la protéine A-HPR diluée au 1/5000<sup>me</sup> dans du TBST. Enfin, la membrane est rincée 3 fois 10 min dans la solution de TBST. La révélation se fait grâce au kit de chimioluminescence Immun-star Western C (BIO-RAD, Marnes-la-coquette, France), selon les procédures standards.

### 6.1.6 Mesure d'apoptose par viabilité cellulaire et caspases

La viabilité cellulaire a été déterminée par le kit CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI), l'apoptose par le kit Caspase-Glo (Promega, Madison, WI). Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits. Les kits sont utilisés en suivant la procédure décrite dans le manuel. Les valeurs de luminescence obtenues pour les cellules exposées au médicament sont rapportées aux valeurs des cellules non traitées, et sont donc exprimées en pourcentage du contrôle. Ensuite, les mesures d'apoptose ont été normalisées à la viabilité cellulaire pour tenir compte de l'évolution temporelle du nombre de cellules par puits. On a donc :  $Apop = \frac{Apop\%control}{Viab\%control}$

## 6.2 Étude de l'apoptose par voie mitochondriale dans les cellules NIH-3T3

### 6.2.1 Microscopie confocale

Pour l'analyse de la relocalisation de BIK aux mitochondries en réponse à une exposition à la staurosporine, les cellules sont préincubées avec du Mitotracker-red (1 :10,000) pendant 20 min, avant d'être rincées dans du milieu de culture pendant 20 min. Ensuite, les cellules sont fixées par l'adjonction de 4% de paraformaldehyde. Le Mitotracker-red est éliminé par une incubation de 10 min dans l'acétone à -20°C, puis les procédures standards sont réalisées. Les protéines de BIK endogènes sont détectées par un anticorps spécifique anti-BIK-BH3 (1 :200). L'anticorps secondaire (Molecular Probe) a été marqué par isothiocyanate de fluorescéine. Les noyaux sont colorés avec du Hoechst-33342 dye (1 : 50,000 dans le milieu de montage). Les images

sont acquises par microscopie confocale sur un Axiovert 100M, LSM510 (Zeiss), en utilisant un objectif Plan Apochromat 63x/1.4 Oil DIC.

## Chapitre 7

# Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse présente une approche pluridisciplinaire biologique et mathématique pour l'optimisation sur base moléculaire des traitements anticancéreux. Une preuve de concept de cette approche a été proposée pour la chronothérapie de l'irinotecan, étudiée sur cultures de cellules Caco-2. Une organisation circadienne d'une période de 26 h 50 (SD 63 min) a été expérimentalement démontrée pour les cellules Caco-2 et a pour conséquence une variation circadienne de la PD du CPT11. Un modèle mathématique de la PK-PD de l'irinotecan a été construit et calibré aux données biologiques.

Il a permis la détermination de schémas d'exposition théoriquement optimaux. En effet, la stratégie thérapeutique adoptée a consisté à maximiser le dommages à l'ADN des cellules non synchronisées, jouant le rôle de cellules cancéreuses, sous une contrainte de toxicité maximale pour les cellules synchronisées, représentant les cellules saines. Les procédures d'optimisation nous ont permis de conclure que l'administration optimale de toute dose de CPT11 consiste en une exposition de 3h40 à 7h10, débutant 1h30 à 1h50 avant le creux du rythme de bioactivation du CPT11 par les CESSs. La validation expérimentale de ces schémas d'exposition théoriquement optimaux constitue la prochaine étape. Ces travaux constitueront alors une première preuve de concept de l'optimisation thérapeutique sur base moléculaire par une approche combinée expérimentale et mathématique.

Notre approche pluridisciplinaire a ensuite été mise en oeuvre dans le but d'optimiser l'administration chronomodulée de l'irinotecan pour trois classes de chronotoxicité précédemment mise en évidence chez la souris. Un modèle de la PK-PD "corps entier" du médicament a été construit. Un ensemble de paramètre a été estimé pour la classe 2 à partir de données biologiques de la PK sanguine et tissulaire du CPT11 et des rythmes circadiens des protéines de sa pharmacologie. Le modèle ainsi calibré reproduit de façon satisfaisante les résultats expérimentaux. L'estimation des paramètres pour les classes 1 et 3 permettra la comparaison des ensembles de paramètres afin de déterminer les différences moléculaires entre les classes. L'étape suivante consiste en l'utilisation de procédures d'optimisation pour concevoir des schémas d'administration chronomodulés optimaux pour chaque classe de souris.

Le modèle "corps entier" conçu pour la souris pourra être adapté pour l'homme en redimensionnant ses paramètres. Le modèle ainsi adapté pourrait être utilisé pour caractériser au niveau moléculaire de futures classes de patients cancéreux. Pour chaque classe, la mise en évidence de déterminants moléculaires de la chronotoxicité à l'irinotecan pourrait être entreprise. Ainsi, ces déterminants pourraient être mesurés dans chaque patient, soit par des biopsies de peau, soit par des prélèvements salivaires, soit en les corrélant avec les rythmes d'activité-repos et de température. Ils seraient ensuite utilisés pour recalibrer le modèle mathématique qui fournirait alors des schémas d'administration personnalisés en fonction des rythmes circadiens du patient.

Enfin, la tyrosine kinase SRC a été étudiée dans des cellules NIH-3T3 parentales, jouant le rôle de cellules saines, et dans les mêmes cellules transfectées avec l'oncogène v-src, qui représentent les cellules cancéreuses. Une approche combinée expérimentale et modélisatrice a été mise en oeuvre pour déterminer les stratégies optimales à appliquer dans le cas particulier de ce système biologique.

Les schémas d'exposition optimaux ont été définis comme ceux maximisant l'apoptose chez les cellules cancéreuses, sous la contrainte d'un pourcentage de cellules apoptotiques maximal dans la population saine. La stratégie thérapeutique théoriquement optimale a consisté en une exposition à la staurosporine, après une administration d'un répresseur de l'expression de BAX (de manière à diminuer sa concentration en-dessous du seuil apoptotique dans les cellules normales, mais pas dans les cellules cancéreuses), combinée à un répresseur de BCL2 ou un inhibiteur de SRC. La prochaine étape consiste en une validation expérimentale de ces combinaisons médicamenteuses théoriquement optimales.

Si ces combinaisons médicamenteuses sont validées par l'expérimentation *in vitro*, elles pourraient ensuite être testées dans des essais cliniques chez des patients cancéreux dont les tissus tumoraux présentent une mutation de l'oncogène SRC menant à un profil moléculaire des protéines de la famille Bcl2 similaire à celui des fibroblastes NIH-3T3 transformés.







## Annexe A

Theoretical Optimization of  
Irinotecan-based Anticancer  
Strategies in case the of  
Drug-induced Efflux, *Applied  
Mathematics Letters*, sous  
presse.

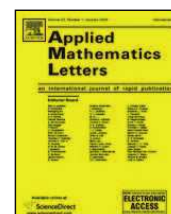




Contents lists available at ScienceDirect

# Applied Mathematics Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aml](http://www.elsevier.com/locate/aml)



## Theoretical optimization of Irinotecan-based anticancer strategies in the case of drug-induced efflux

Annabelle Ballesta<sup>a,b,c,\*</sup>, Jean Clairambault<sup>a,b,c</sup>, Sandrine Dulong<sup>b,c</sup>, Francis Levi<sup>b,c,d</sup>

<sup>a</sup> INRIA Rocquencourt, BANG project team, Domaine de Voluceau BP105, 78153 Le Chesnay Cedex, France

<sup>b</sup> INSERM, U776 "Rythmes biologiques et cancers", Hôpital Paul Brousse, 91405 Villejuif, France

<sup>c</sup> Université Paris-Sud, UMR-S0776, 91405 Orsay, France

<sup>d</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Unité de Chronothérapie, Département d'oncologie médicale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

### article info

#### Article history:

Received 3 February 2011

Accepted 22 February 2011

#### Keywords:

Molecular modeling

Anticancer drug

Pharmacokinetics–pharmacodynamics

Therapeutics optimization

Drug-driven transporter induction

### abstract

The anticancer drug Irinotecan (CPT11) is known to trigger the induction of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters, responsible for the efflux of the drug and its metabolites outside of the cells. The drug-modulated overexpression of those transporters prevents its accumulation in the intracellular medium, therefore decreasing its efficacy. A critical clinical concern lies in the design of CPT11-based therapeutic strategies which eradicate a maximum number of cancer cells despite their ability to become resistant. In order to address this issue, we supplemented an existing mathematical model of CPT11 molecular pharmacokinetics–pharmacodynamics (PK–PD) with a new model of CPT11-induced overexpression of ABC transporters. We then theoretically optimized exposure to CPT11 given as a single agent or combined either with ABC transporter inhibitors, or with inhibitors of nuclear factors whose activation is responsible for transporter overexpression. We firstly considered a cancer cell population endowed with the ability of inducing their transporters. For any drug combination, we concluded that the highest concentration of CPT11 should be administered in order to kill a maximum number of cancer cells, despite the triggering of resistance. We then considered a population of healthy cells which were assumed to be identical to cancer cells except that they were not able to become resistant. Optimal schemes were defined as the ones which maximized DNA damage in cancer cells under the constraint of DNA damage in healthy cells not exceeding a tolerability threshold. The optimal therapeutic strategy consisted in combining CPT11 with ABC transporter inhibitors as it achieved a complete reversal of resistance by means of the lowest concentrations of CPT11.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Multidrug resistance (MDR) is characterized by the ability of cancer cells to become simultaneously resistant to many anticancer drugs. A possible cellular mechanism of MDR is the drug-modulated induction of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters which actively pump molecules outside of the cells [1]. The enhancement of ABC transporter expression in

**Abbreviations:** MDR, Multidrug resistance; ABC transporter, ATP-binding cassette transporter; CPT11, irinotecan; PK–PD, pharmacokinetics–pharmacodynamics; CES, carboxylesterases; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; TOP1, topoisomerase 1; NF-KB, Nuclear factor KB; NRF-2, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2.

\* Corresponding author at: INRIA Rocquencourt, BANG project team, Domaine de Voluceau BP105, 78153 Le Chesnay Cedex, France. Tel.: +33 0 1 39 63 58 86; fax: +33 0 1 39 63 58 82.

E-mail address: [annabelle.ballesta@inria.fr](mailto:annabelle.ballesta@inria.fr) (A. Ballesta).

tumor tissues prevents anticancer drugs from accumulating in the intracellular medium and therefore decreases their efficacy. Irinotecan (CPT11) is a cytotoxic drug approved for the treatment of colorectal cancer [2]. CPT11 is a substrate for several ABC transporters and is known to trigger their induction in cancer cell lines [3–5]. We propose here to theoretically optimize CPT11-based therapeutic strategies in the case of MDR.

To address this concern, we designed a mathematical model for CPT11-driven transporter induction by extending an existing model of CPT11 molecular pharmacokinetics–pharmacodynamics (PK–PD) [6]. We then theoretically investigated optimal therapeutic strategies which circumvent resistance in cancer cells. We firstly searched for exposure schemes which maximized DNA damage within a population of cancer cells endowed with the ability of inducing their transporters. Then we considered a second population defined as healthy cells which were identical to the cancer ones except that they were not endowed with the considered resistant mechanism. Optimal exposure schemes were defined as the ones that maximized DNA damage in cancer cells under the constraint of DNA damage in healthy cells not exceeding a tolerability threshold. We investigated three drug combinations: CPT11 given as a single agent, combined with ABC transporter inhibitors, or combined with inhibitors of nuclear factors whose activation is responsible for ABC transporter induction.

## 2. The existing mathematical model of CPT11 molecular PK–PD

A mathematical model of CPT11 molecular PK–PD was previously built and fitted to *in vitro* experimental data [6]. It describes molecular events occurring within a cell population during CPT11 exposure. Briefly, CPT11 in the intracellular medium ( $CPT_{in}$ ) is converted into its active metabolite SN38 ( $SN_{in}$ ) under the catalytic activity of carboxylesterases ( $CES$ ). SN38 is deactivated into SN38G through UDP-glucuronosyltransferase enzymes ( $UGT$ ) [2]. CPT11, SN38 and SN38G are assumed to enter passively into the cytoplasm but to be actively expelled outside of the cells by several transporters of the ABC superfamily. The variable  $ABC\_CPT$  represents transporters responsible for CPT11 efflux and stands for the cumulative activity of ABCB1, ABCC1 and ABCC2. Transporters of SN38 and SN38G are denoted by the variable  $ABC\_SN$  which represents the activity of ABCC1, ABCC2 and ABCG2 [6].

$$\frac{d[CPT_{in}]}{dt} = k_{upCPT}[CPT_{out}] - \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}]} - \frac{V_{ces}[CES][CPT_{in}]}{K_{ces} + [CPT_{in}]} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[SN_{in}]}{dt} = & k_{upSN}[SN_{out}] - \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{in}]}{K_{effSN} + [SN_{in}]} + \frac{V_{ces}[CES][CPT_{in}]}{K_{ces} + [CPT_{in}]} \\ & - \frac{V_{ugt}[UGT][SN_{in}]}{K_{ugt} + [SN_{in}]} - k_{f2}[DNATOP1][SN38_{in}] + k_{r2}[Compl]. \end{aligned} \quad (2)$$

CPT11 is an inhibitor of topoisomerase 1 (TOP1), an enzyme which relaxes supercoiled DNA by creating transient single-stranded breaks [7]. The active metabolite SN38 stabilizes DNA/TOP1 complexes into reversible SN38/TOP1/DNA ones ( $Compl$ ) which still spontaneously dissociate but at a much slower rate. Collisions between those ternary complexes and replication or transcription mechanisms create irreversible DNA damage ( $Icompl$ ) which trigger DNA repair, cell cycle arrest and lead possibly to apoptosis [7].  $Icompl$  is the output variable of the model as it has been experimentally correlated with CPT11 cytotoxicity [6].

$$\frac{d[Compl]}{dt} = k_{f2}[DNATOP1][SN_{in}] - k_{r2}[Compl] - k_{irr}[Compl] \quad (3)$$

$$\frac{d[Icompl]}{dt} = k_{irr}[Compl]. \quad (4)$$

## 3. Adding CPT11-modulated ABC transporter induction

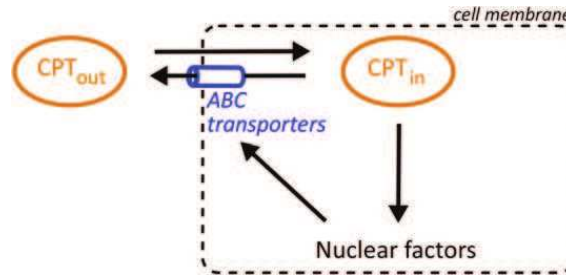
CPT11 exposure may enhance the expression of ABCB1 and ABCG2 both in cancer cell lines and in tumor tissues in patients [3–5]. Therefore we supplemented the existing mathematical model of CPT11 PK–PD with a representation of the drug-driven transporter induction.

A possible molecular mechanism leading to this induction consists in the activation by CPT11-induced DNA damage of nuclear factors which then promote the expression of ABC transporters (Fig. 1). Indeed, in cancer cell lines, DNA double-stranded breaks resulting from CPT11 exposure activate the nuclear factor NF- $\kappa$ B [8–10] which enhances ABCB1 expression [11,12]. In the same way, chemical stress may activate the nuclear factor NRF-2 which is known to promote the expression of ABCG2, ABCC1 and ABCC2 [13–16].

We thus propose the following model for mRNA and protein amounts of ABC transporters responsible for CPT11 and SN38 efflux:

$$\frac{d[ABC\_X_{RNA}]}{dt} = k_{fRNA} + k_{ind} \frac{[Icompl]^n}{th_{ind}^n + [Icompl]^n} - k_{dRNA}[ABC\_X_{RNA}] \quad (5)$$

$$\frac{d[ABC\_X_{Prot}]}{dt} = k_{fABC}[ABC\_X_{RNA}] - k_{dABC}[ABC\_X_{Prot}] \quad (6)$$



**Fig. 1. CPT11-driven transporter induction** CPT11 in the extracellular medium ( $CPT_{out}$ ) enters passively in the cytoplasm ( $CPT_{in}$ ). It is then actively expelled outside of the cells by efflux pumps called ABC transporters.  $CPT_{in}$  creates DNA damage responsible for the activation of nuclear factors which promote ABC transporter expression. The enhanced active efflux results in a decreased intracellular drug concentration and therefore confers resistance to the cells.

where  $ABC\_X$  stands either for  $ABC\_CPT$  or for  $ABC\_SN$ . In the absence of CPT11, ABC transporter mRNA expression  $ABC\_X_{RNA}$  is the result of transcription ( $k_{fRNA}$ ) and degradation ( $k_{dABC}$ ). ABC transporter proteins  $ABC\_X_{Prot}$  arise from the translation of  $ABC\_X_{RNA}$  ( $k_{fABC}$ ) and are degraded by the cell ( $k_{dABC}$ ). mRNA molecules were assumed not to be consumed by the translation mechanism as one mRNA molecule may produce several proteins.

Nuclear factor activation by CPT11 is phenomenologically modeled in Eq. (5) by an S-shaped function which shows a steep increase when DNA damage ( $I_{compl}$ ) exceeds the induction threshold  $th_{ind}$ . Indeed experimental results show that CPT11 induces a rapid and transient activation of the nuclear factor NF- $\kappa$ B which is dose-dependent and rapidly saturates when the dose of CPT11 is increased [9,10]. This modeling choice results in a persistent overexpression of transporter mRNA and protein amounts which lasts after the drug exposure. Indeed the reversal of transporter induction was observed only after two months in cultured cell lines [4]. It is neglected here since our concern is to design *short-term* optimal exposure schemes.

For the sake of simplicity, we assumed that  $ABC\_X_{RNA}$  and  $ABC\_X_{Prot}$  are equal to  $1\ \mu\text{M}$  at steady state in the absence of drug and therefore set  $k_{fRNA} = 1\ \mu\text{M}$ ,  $k_{dRNA} = 1\ \text{h}^{-1}$  and  $k_{fABC} = k_{dABC}$ . We assumed that this is the first time that cells are exposed to CPT11. Therefore, at the initial instant, transporter mRNA and protein amounts are equal to 1. All other variables are equal to 0 except CPT11 extracellular concentration which is set to the chosen exposure concentration.

Other parameter values were estimated by fitting experimental data from the literature in which a 6-fold increase in ABCB1 mRNA level and a 2-fold increase in its protein amount were observed after 96 h of exposure to SN38 [3]. We assumed that these kinetics occurred for an exposure to  $80\ \mu\text{M}$  of CPT11 and obtained:  $n = 20$ ,  $k_{fABC} = k_{dABC} = 0.1\ \text{h}^{-1}$ ,  $k_{ind} = 5\ \mu\text{M}\ \text{h}^{-1}$  and  $th_{ind} = 0.13\ \mu\text{M}$ .

#### 4. Optimal therapeutic strategies in the case of MDR

##### 4.1. Considered drug combinations

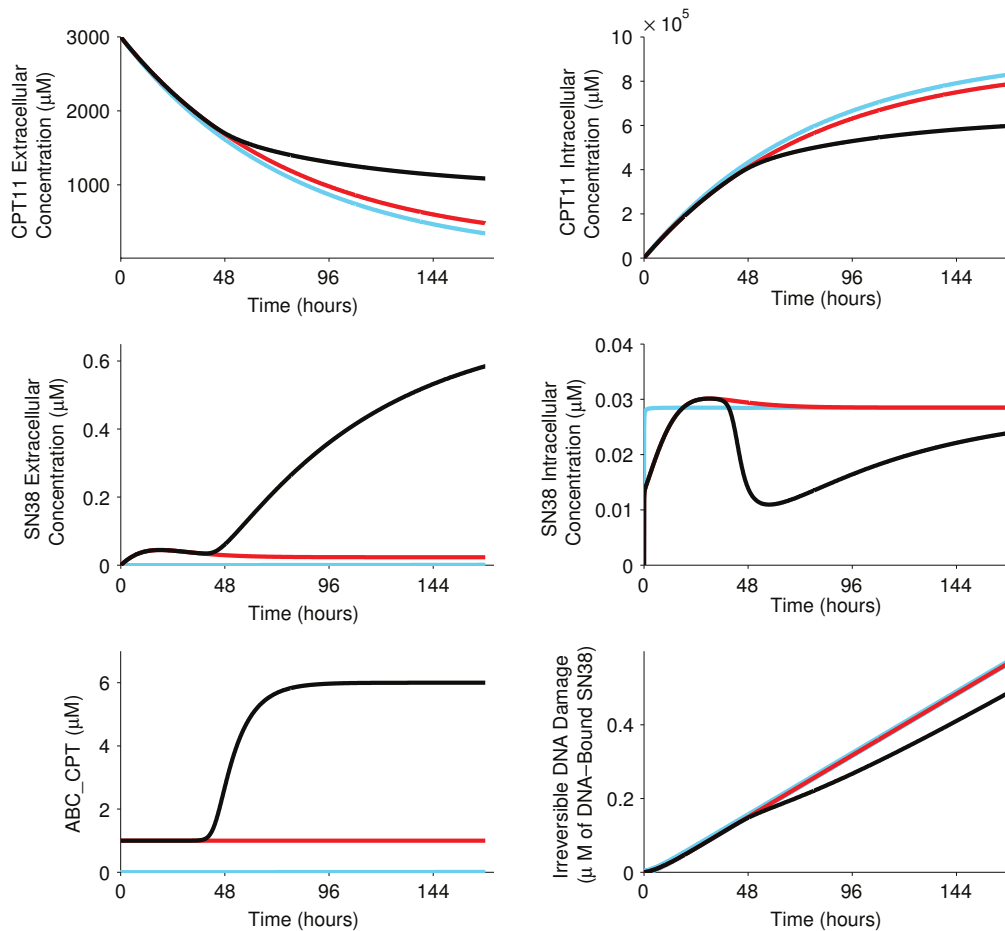
The aim of this part is to optimize CPT11-based therapeutics in the case of MDR. Clinical strategies aiming at reversing MDR mainly consist in inhibiting ABC transporters by pharmacological agents [1]. Another possibility inferred from mathematical modeling consists in inhibiting nuclear factors. Several inhibitors of NF- $\kappa$ B are currently under clinical studies [17]. Their administration in combination with CPT11 do enhance cell sensitivity to the drug. However, NF- $\kappa$ B displays a well-studied anti-apoptotic activity, which inhibition may be responsible for this increase in cell death [18,19]. We therefore considered three drug combinations: CPT11 given as a single agent, combined with ABC transporter inhibitors or combined with nuclear factor inhibitors.

CPT11 administration consisted in exposing cells to an extracellular medium containing the drug at an initial concentration ranging from 0 to  $3000\ \mu\text{M}$ . This interval of concentrations was chosen as it resulted in SN38 extracellular concentrations between 0 and  $0.15\ \mu\text{M}$  in the absence of transporter induction, which are physiological values for SN38 blood concentration in patients [20]. Exposure duration was searched between 1 and 168 h. Transporter or nuclear factor inhibitor administration was assumed to start before CPT11 exposure so that the system was at steady state when CPT11 was added to the culture medium. Nuclear factor inhibitors were modeled by setting  $k_{ind}$  to 0 for  $ABC\_CPT$  and  $ABC\_SN$ , which corresponds to a complete inhibition. ABC transporter inhibitors  $I\_ABC$  were modeled as competitive inhibitors which irreversibly trap transporters into complexes:

$$\frac{[ABC\_X_{Prot}]}{dt} = k_{fABC}ABC\_X_{RNA} - k_{dABC}[ABC\_X_{Prot}] - k_{inhib}[I\_ABC][ABC\_X_{Prot}] \quad (7)$$

$$\frac{[I\_ABC]}{dt} = -k_{inhib}[I\_ABC][ABC\_X_{Prot}]. \quad (8)$$

Inhibitor concentrations were assumed to be high enough to completely inhibit transporters in the absence of drug-driven induction. Therefore,  $ABC\_CPT$  and  $ABC\_SN$  were set to 0 at the initial instant. Inhibitor concentrations were set to  $200\ \mu\text{M}$



**Fig. 2. Maximizing DNA damage in cancer cells without tolerability constraint.** Time evolution of CPT11 and SN38 in intra and extracellular compartments, of ABC\_CPT transporter protein amount and of the drug-induced irreversible complexes  $I_{comp}$ , during optimal exposure to CPT11 given as a single agent (black), combined with nuclear factor inhibitors (red), or with ABC transporter inhibitors (blue). For any drug combination, the optimal exposure scheme consisted in administering the highest concentration of CPT11 (3000  $\mu\text{M}$ ) over the longest duration (168 h). When CPT11 was administered as a single agent, cancer cells increased ABC transporter expression so that the intracellular concentrations of CPT11 and SN38 were decreased, and thus created less DNA damage. The co-administration of nuclear factor or ABC transporter inhibitors prevented transporter overexpression and increased CPT11-induced DNA damage. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

at initial instant and  $k_{inhib}$  was set to 1 so that the inhibition of transporter induction was rapid and complete. For each drug combination, the optimization procedure consisted in searching for the optimal concentration of CPT11 and the optimal exposure duration.

#### 4.2. Maximizing DNA damage within cancer cells

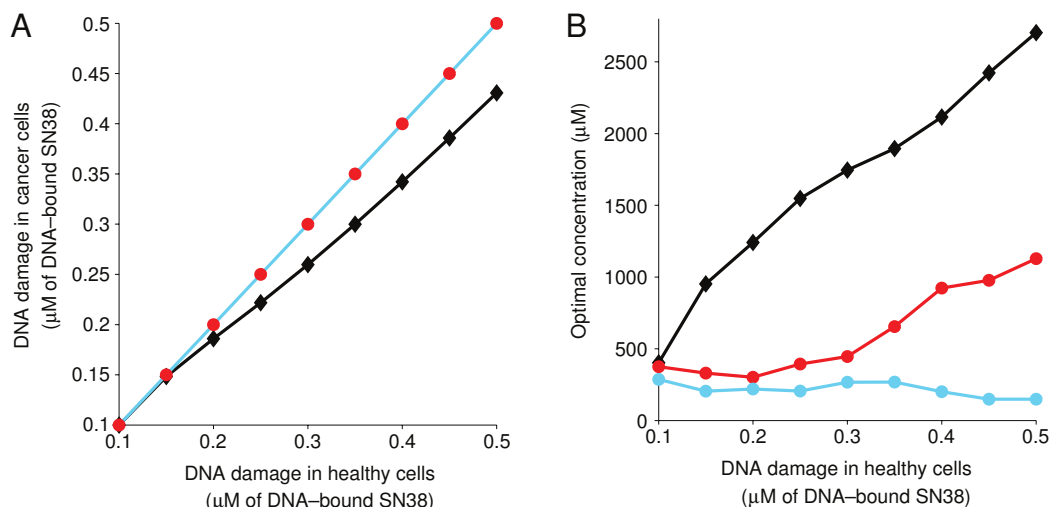
First, we considered a population of cancer cells endowed with the mechanism of drug-driven transporter induction. We searched for exposure schemes which maximized DNA damage in these cancer cells without any tolerability constraint. The optimization procedure consisted in minimizing the opposite of the variable  $I_{comp}$  using the evolutionary algorithm CMAES [21].

For CPT11 given as a single agent, the optimal exposure scheme consisted in administering the highest concentration of 3000  $\mu\text{M}$  over the longest duration equal to 168 h, despite the triggering of resistance (Fig. 2). This result thus suggests that cancer cells should be exposed to the highest tolerable dose of CPT11 so that the largest amount of DNA damage is created before they overexpress their transporters. The same optimal exposure scheme was found when CPT11 was co-administered with nuclear factor or transporter inhibitors, as no tolerability constraint was considered in this case. It can be noted that in the case of CPT11 given as a single agent, SN38 extracellular concentration was largely higher than when the drug was combined with inhibitors because SN38 enhanced efflux prevented its deactivation into SN38G which occurs in the intracellular medium.

#### 4.3. Maximizing DNA damage within cancer cells under a constraint of tolerability

We then considered a population of healthy cells which were defined as identical to the previously mentioned cancer cells except that they were not endowed with the ability of enhancing ABC transporter expression in response to drug exposure.





**Fig. 3. Maximizing DNA damage in cancer cells with tolerability constraint** Comparison of three therapeutic strategies: exposure to CPT11 as a single agent (black, diamond), combined with nuclear factor inhibitors (red, circle), or combined with ABC transporter inhibitors (blue, circle). **A.** DNA damage in cancer cells with respect to the maximal allowed DNA damage in healthy cells: combining CPT11 with inhibitors of nuclear factors or of ABC transporters completely reversed the resistance of cancer cells. **B.** Optimal concentrations with respect to maximal allowed DNA damage in healthy cells: optimal concentrations in the case of CPT11 combined with nuclear factor inhibitors were approximately half the ones found when CPT11 was given as a single agent. Combining CPT11 with ABC transporter inhibitors allowed a larger decrease in the optimal concentration to be administered. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Optimal exposure schemes were defined as the one that maximized DNA damage in cancer cells under the constraint of DNA damage in healthy cells not exceeding a tolerability threshold [6,22]. We determined optimal exposure schemes for a toxicity threshold ranging from 0.1 to 0.5  $\mu\text{M}$  of DNA-bound SN38. The optimization procedure consisted in the minimization by the CMAES algorithm of a cost function which was the sum of two terms. The first term consisted in the opposite of DNA damage  $I_{compl}$  in cancer cells which typically ranged from 0 to 0.5  $\mu\text{M}$  of DNA-bound SN38. The second term accounted for the toxicity constraint. It was equal to 0 when  $I_{compl}$  in healthy cells was under the tolerability threshold and became equal to 1000 otherwise. Optimization procedures gave the following results for each considered drug combination.

For any toxicity threshold, optimal exposure schemes when CPT11 was given as a single agent consisted in administering a concentration of 370–2700  $\mu\text{M}$  over a duration ranging from 36–152 h, linearly increasing with the allowed toxicity (Fig. 3). When the toxicity threshold was lower than the resistance threshold (0.13  $\mu\text{M}$  of DNA-bound SN38), DNA damage in healthy and cancer cells were the same since resistance was not triggered. On the contrary, when the induction threshold was exceeded, the optimal exposure schemes resulted in 12% more DNA damage in healthy cells than in cancer cells which triggered their resistance mechanism.

The combination of CPT11 with nuclear factor inhibitors allowed a decrease in optimal concentrations of CPT11 which were equal to approximately half the ones found when CPT11 was given as a single agent, optimal exposure durations remaining the same (Fig. 3). Moreover, the administration of nuclear factor inhibitors completely annihilated the advantage of resistant cells so that DNA damage in healthy and cancer cells were equal.

The use of ABC transporter inhibitors combined with CPT11 further decreased optimal concentrations of CPT11 to be administered which ranged between 150 and 290  $\mu\text{M}$  (Fig. 3). Optimal durations were slightly decreased compared to the other drug combinations and linearly increased with the allowed toxicity from 32 to 148 h. This strategy also allowed a complete circumvent of resistance as DNA damage in healthy and cancer cells were equal. We therefore concluded that this strategy was the optimal one as it involved the lowest concentrations of CPT11 to completely reverse resistance.

## 5. Discussion

To the best of our knowledge, two other published works modeled ABC transporter induction. A mathematical model of doxorubicin PK–PD includes transporter overexpression which is assumed to be directly proportional to the intracellular drug concentration [23]. This modeling assumption does not render an account of the experimentally observed threshold on drug concentrations above which resistance is triggered. Moreover, this model allows the quantity of ABC transporters to grow to infinity in the case of large drug concentrations. Our modeling choice prevents ABC transporter amount to grow to infinity as the induction term rapidly reaches its maximal value  $k_{ind}$  when DNA damage  $I_{compl}$  increases.

Another work models the molecular PK–PD of 5-fluorouracil and includes the drug-induced transporter overexpression [20]. In this model, the nuclear factor remains activated as long as the drug intracellular concentration exceeds an induction threshold. However NF–KB kinetics in the presence of CPT11 consists in a transient activation of few hours which vanishes before the drug removal [9]. Furthermore, this modeling choice implies that killing a maximum number of cancer cells is achieved by an exposure to a dose below the induction threshold during a long period in order not to trigger the resistant

mechanism. On the contrary, our model concludes that the resistant mechanism is going to be triggered anyhow and that the highest tolerable dose should be given during the first cell exposure in order to kill a maximum number of cancer cells before they overexpress their transporters and become resistant.

This study concludes that combining ABC transporter inhibitors with CPT11 is the optimal therapeutic strategy as it involved the lowest concentrations of CPT11 to completely reverse MDR. However, we did not take into account the possible toxicity induced by the inhibitors themselves. Indeed several ABC transporter inhibitors display bone-marrow and neurological toxicity [1].

## 6. Conclusion

This article presents an extended model of CPT11 molecular PK-PD which includes the drug-induced transporter overexpression. The model predicted that, in order to kill a maximum number of resistant cells, the highest tolerable concentration of CPT11 should be administered during the first exposure, in order to create the largest amount of DNA damage when cells have not overexpressed their transporters yet. Now considering a tolerability constraint, we concluded that the combination of CPT11 with ABC transporter inhibitors was the optimal therapeutic strategy as it allowed a complete reversal of resistance by means of the lowest concentrations of CPT11.

## References

- [1] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer* 2 (1) (2002) 48–58.
- [2] R.H. Mathijssen, R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, et al., Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT11), *Clin. Cancer Res.* 7 (8) (2001) 2182–2194.
- [3] Y. Takeba, S. Sekine, T. Kumai, N. Matsumoto, S. Nakaya, Y. Tsuzuki, et al., Irinotecan-induced apoptosis is inhibited by increased *P*-glycoprotein expression and decreased p53 in human hepatocellular carcinoma cells, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (8) (2007) 1400–1406.
- [4] Y. Bessho, T. Oguri, H. Achiwa, H. Muramatsu, H. Maeda, T. Niimi, S. Sato, R. Ueda, Role of ABCG2 as a biomarker for predicting resistance to CPT-11/SN-38 in lung cancer, *Cancer Sci.* 97 (3) (2006) 192–198.
- [5] L. Candèil, I. Gourdièr, D. Peyron, N. Vezzio, V. Copois, F. Bibeau, et al., ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases, *Int. J. Cancer* 109 (6) (2004) 848–854.
- [6] A. Ballesta, S. Dulong, C. Abbara, B. Cohen, A. Okyar, J. Clairambault, F. Levi, A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery, *PLoS Comput. Biol.* (submitted for publication).
- [7] Y. Pommier, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nat. Rev. Cancer* 6 (10) (2006) 789–802.
- [8] Y. Habraken, J. Piette, NF- $\kappa$ B activation by double-strand breaks, *Biochem. Pharmacol.* 72 (9) (2006) 1132–1141. Epub 2006 Sep 11.
- [9] T.T. Huang, S.M. Wuerzberger-Davis, B.J. Seufzer, S.D. Shumway, T. Kurama, D.A. Boothman, S. Miyamoto, NF- $\kappa$ B activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events, *J. Biol. Chem.* 275 (13) (2000) 9501–9509.
- [10] V. Bottero, V. Busuttill, A. Loubat, N. Magna, J.L. Fischel, G. Milano, J.F. Peyron, Activation of nuclear factor  $\kappa$ B through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells, *Cancer Res.* 61 (21) (2001) 7785–7791.
- [11] M. Bentires-Alj, V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.P. Merville, V. Bours, NF- $\kappa$ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells, *Oncogene* 22 (1) (2003) 90–97.
- [12] N. Kameyama, S. Arisawa, J. Ueyama, S. Kagota, K. Shinozuka, A. Hattori, et al., Increase in *P*-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (5) (2008) 355–360. Epub 2008 Mar 4.
- [13] T. Adachi, H. Nakagawa, I. Chung, Y. Hagiya, K. Hoshijima, N. Noguchi, M.T. Kuo, T. Ishikawa, Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCB1, ABCB2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress, *J. Exp. Ther. Oncol.* 6 (4) (2007) 335–348.
- [14] A. Hayashi, H. Suzuki, K. Itoh, M. Yamamoto, Y. Sugiyama, Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (3) (2003) 824–829.
- [15] J.M. Maher, X. Cheng, A.L. Slitt, M.Z. Dieter, C.D. Klaassen, Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver, *Drug Metab. Dispos.* 33 (7) (2005) 956–962. Epub 2005 Apr 15.
- [16] I.M. Copple, C.E. Goldring, N.R. Kitteringham, B.K. Park, The Keap1-Nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity, *Handb. Exp. Pharmacol.* (196) (2010) 233–266.
- [17] S. Sebens, A. Arlt, H. Schafer, NF- $\kappa$ B as a molecular target in the therapy of pancreatic carcinoma, *Recent Results Cancer Res.* 177 (2008) 151–164.
- [18] J.C. Cusack Jr., R. Liu, A.S. Baldwin Jr., Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation, *Cancer Res.* 60 (9) (2000) 2323–2330.
- [19] J. Guo, U.N. Verma, R.B. Gaynor, E.P. Frenkel, C.R. Becerra, Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B p65 subunit, *Clin. Cancer Res.* 10 (10) (2004) 3333–3341.
- [20] F. Levi, A. Okyar, S. Dulong, P.F. Innominato, J. Clairambault, Circadian timing in cancer treatments, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010) 377–421.
- [21] N. Hansen, The CMA evolution strategy: a comparing review. Towards a new evolutionary computation, in: *Advances on Estimation of Distribution Algorithms*, Springer, 2006, pp. 75–102.
- [22] C. Basdevant, J. Clairambault, F. Levi, Optimisation of time-scheduled regimen for anti-cancer drug infusion, *ESAIM:M2AN* 39 (6) (2005) 1069–1086.
- [23] K.T. Luu, J.A. Uchizono, *P*-glycoprotein induction and tumor cell-kill dynamics in response to differential doxorubicin dosing strategies: a theoretical pharmacodynamic model, *Pharm. Res.* 22 (5) (2005) 710–715. Epub 2005 May 17.





## Annexe B

A Combined Experimental and  
Mathematical Approach for  
Molecular-based Optimization  
of Irinotecan Circadian  
Delivery, *PloS Computational  
Biology*, en cours de révision



# A Combined Experimental and Mathematical Approach for Molecular-based Optimization of Irinotecan Circadian Delivery

A. Ballesta<sup>1,2,3,\*</sup>, S. Dulong<sup>2,3</sup>, C. Abbara<sup>4</sup>, B. Cohen<sup>2,3</sup>, A. Okyar<sup>2,3,5</sup>,  
J. Clairambault<sup>1,2,3</sup>, F. Levi<sup>2,3,4</sup>

**1** INRIA Rocquencourt, BANG project team, Domaine de Voluceau BP105, F-78153 Le Chesnay Cedex, France

**2** INSERM, U776 "Rythmes biologiques et cancers", Hôpital Paul Brousse, F-94807 Villejuif, France

**3** Université Paris-Sud, UMR-SO776, F-91405 Orsay, France

**4** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Unité de Chronothérapie, Département d'oncologie médicale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

**5** Istanbul University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, TR-34116 Beyazit, Istanbul, Turkey

\* E-mail: [annabelle.ballesta@inria.fr](mailto:annabelle.ballesta@inria.fr)

## Abstract

Circadian timing largely modifies efficacy and toxicity of many anticancer drugs. Recent findings suggest that optimal circadian delivery patterns depend on the patient genetic background. We present here a combined experimental and mathematical approach for the design of chronomodulated administration schedules tailored to the patient molecular profile. As a proof of concept we optimized exposure of Caco-2 colon cancer cells to irinotecan (CPT11), a cytotoxic drug approved for the treatment of colorectal cancer. CPT11 was bioactivated into SN38 and its efflux was mediated by ATP-Binding-Cassette (ABC) transporters in Caco-2 cells. After cell synchronization with a serum shock defining Circadian Time (CT) 0, circadian rhythms with a period of 26 h 50 (SD 63 min) were observed in the mRNA expression of clock genes *REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, *BMAL1*, the drug target topoisomerase 1 (*TOP1*), the activation enzyme carboxylesterase 2 (*CES2*), the deactivation enzyme UDP-glucuronosyltransferase 1, polypeptide A1 (*UGT1A1*), and efflux transporters *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* and *ABCG2*. DNA-bound TOP1 protein amount in presence of CPT11, a marker of the drug PD, also displayed circadian variations. A mathematical model of CPT11 molecular pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) was designed

and fitted to experimental data. It predicted that CPT11 bioactivation was the main determinant of CPT11 PD circadian rhythm. We then adopted the therapeutics strategy of maximizing efficacy in non-synchronized cells, considered as cancer cells, under a constraint of maximum toxicity in synchronized cells, representing healthy ones. We considered exposure schemes in the form of an initial concentration of CPT11 given at a particular CT, over a duration ranging from 1 to 27 h. For any dose of CPT11, optimal exposure durations varied from 3h40 to 7h10. Optimal schemes started between CT2h10 and CT2h30, a time interval corresponding to 1h30 to 1h50 before the nadir of CPT11 bioactivation rhythm in healthy cells.

## Author Summary

Treatment timing within the 24-h timescale, that is, circadian (circa, about; dies, day) timing, can change by several fold the tolerability and antitumor efficacy of anticancer agents both in experimental models and in cancer patients. Chronotherapeutics aims at improving the tolerability and/or the efficacy of medications through the administration of treatments according to biological rhythms. Recent findings highlight the need of individualizing circadian delivery schedules according to the patient genetic background. In order to address this issue, we propose a combined experimental and mathematical approach in which molecular mathematical models are fitted to experimental measurements of critical biological variables in the studied experimental model or patient. Optimization procedures are then applied to the calibrated mathematical model for the design of theoretically optimal circadian delivery patterns. As a first proof of concept we focused on the anticancer drug irinotecan. A mathematical model of the drug molecular PK-PD was built and fitted to experimental data in Caco-2 colon cancer cells. Numerical algorithms were then applied to theoretically optimize the chronomodulated exposure of Caco-2 cells to irinotecan.

## Introduction

Circadian timing largely modifies efficacy and toxicity of many anticancer drugs. Chronomodulated administration schemes for patients have been designed based on chronotoxicity results obtained in mice and subsequently validated in clinical trials in which all patients have received the same regimen. However



recent findings highlight the need of personalizing circadian delivery according to the patient gender and genetic background ([1,2]). The systems biology approach presented here aims at designing optimal chronotherapeutics schedules using mathematical models fitted to the patient molecular profile. We propose here an *in vitro* proof of concept which focuses on irinotecan (CPT11), a cytotoxic drug approved for the treatment of colorectal cancer ([3]). CPT11 efficacy and toxicity display circadian rhythms in mice ([4,5]) and in patients ([6,7]). Its circadian administration is here optimized in cell culture using a combined experimental and mathematical approach.

Most biological functions in mammals such as rest-activity, body temperature or hormonal secretions, display rhythms of period between 20 and 28 h called circadian rhythms. Circadian changes are coordinated by the suprachiasmatic nuclei (SCN), an endogenous pacemaker located in the hypothalamus. SCN functions display an intrinsic genetically-determined period which is entrained and calibrated at precisely 24 h by environmental synchronizers such as the alternation of days and nights, socio-professional routines and meal timing ([8]). This central pacemaker controls through rhythmic physiological signals the molecular circadian clock present in each nucleated cell. The cellular molecular clock is constituted of interconnected regulatory loops involving about 15 clock genes such as *CLOCK*, *PER*, *BMAL*, or *REV-ERB $\alpha$* . Those genes display circadian rhythms in their expression and generate in turn circadian oscillations of various gene and protein amounts. ([9]). In particular, many enzymes involved in drug metabolism, cell cycle, DNA repair or apoptosis display circadian variations and induce rhythms in the toxicity and efficacy of many anticancer drugs. The circadian organization is often disrupted in tumor tissues. This temporal difference between normal and cancer cells is exploited in cancer chronotherapeutics by targeting the circadian time of minimum toxicity in healthy cells ([8]).

*In vitro* chronotherapeutics studies derive their rationale from the fact that each nucleated cell is endowed with a molecular circadian clock. Nevertheless, in the absence of external synchronizer, the millions of cells contained in a Petri dish oscillate neither with the same phase nor with the same period ([10,11]). Synchronization with a serum shock (exposure to a large amount of nutrients ([12])), drugs ([13]) or temperature cycles ([14]) resets the cellular clocks which then oscillate in synchrony with a circadian period. Of note, the serum shock may activate transcription factors which induce a transient overshoot in the expression of some genes during the first periods.

As CPT11 is highly toxic for the colon mucosa and efficient against colorectal adenocarcinomas, the human colon cancer cell line Caco-2 was chosen for this *in vitro* study. Caco-2 cells constitute a well-established cellular model for investigating both colon physiology and colon cancer susceptibility to drugs. Furthermore, they do express clock genes ([15]).

Concerning CPT11 PK, the drug is bioactivated by CESs into SN38 which is 100 to 1000-fold more cytotoxic ([16,17]). SN38 is deactivated into SN38G by glucuronidation through mainly UGT1A1 ([18]) and other UGT1As ([19]). CPT11 cellular uptake is passive in intestinal cells whereas that of SN38 occurs passively only at low pH when the carboxylate form is predominant. The uptake of SN38 lactone form is possibly mediated by active mechanisms ([20,21]). CPT11 and its metabolites are actively expelled outside of the cells by transporters of the ABC super-family. CPT11 is preferentially transported by ABCB1, ABCC1 and ABCC2; SN38 by ABCG2, ABCC1 and ABCC2; and SN38G by ABCC2 and ABCG2 ([22], [23]).

CPT11 is an inhibitor of TOP1, an enzyme present in all nucleated cells ([24]). Its function is to relax DNA which may be supercoiled by several processes including replication and transcription. TOP1 binds to DNA and cuts one strand which is thus able to rotate around the molecule. Then TOP1 dissociates from DNA allowing the reconnection of the broken strand. CPT11 and its active metabolite SN38 prevent TOP1 religation by creating DNA/TOP1/drug complexes which can spontaneously dissociate but have a longer lifetime than DNA/TOP1 complexes. Collisions between those ternary reversible complexes and replication or transcription mechanisms convert them into irreversible covalent DNA damage which triggers DNA repair and possibly leads to cell cycle arrest and apoptosis ([24,25]). The amount of TOP1 complexes on the DNA has been experimentally correlated to CPT11 cytotoxicity both *in vitro* and in patients ([26,27]).

Several genes and proteins involved in CPT11 PK-PD display circadian rhythms in mice including the drug target *top1*, the activation enzymes *ces1* and *ces2*, the deactivation enzyme *ugt1a1* and the efflux transporters *abcb1a*, *abcb1b* and *abcc2* ([2,28–30]).

We implemented here a combined experimental and mathematical approach for optimizing CPT11 circadian delivery according to the critical molecular determinants of its chronotoxicity.

## Results

### CPT11 PK-PD in non-synchronized cells

CPT11 accumulated into non-synchronized Caco-2 cells (Figure 2). Approximately 0.1% of its total amount was bioactivated into SN38. Verapamil drastically increased the intracellular accumulation of CPT11 and slightly decreased its extracellular concentration. This confirmed the influence on CPT11 efflux of ABCB1, ABCC1 and ABCC2, three transporters inhibited by verapamil. The increase in CPT11 intracellular concentration in presence of verapamil resulted in increased SN38 production. Nevertheless SN38 intracellular concentration remained similar whereas SN38 extracellular concentration increased in presence of the inhibitor which therefore did not alter SN38 efflux.

### Circadian control of CPT11 PK-PD in synchronized cells

Three clock genes (*REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, *BMAL1*) and seven pharmacological genes (*TOP1*, *UGT1A1*, *CES2*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*) displayed circadian rhythms in their mRNA expression in synchronized Caco-2 cells (Figure 3). Experimental time series were fitted to equation 13 (cf. Materials and Methods) and a common period of 26 h 50 (SD 63 min) was found (Table 1). Oscillations were damped for all genes except *BMAL1* and *CES2*. Some variability was encountered between the four experiments which explained the weak amplitude of *CES2* rhythm (cf. Supporting Information). Despite the circadian variations of *TOP1* mRNA expression no consistent rhythm was found in its nucleic protein level (data not shown).

DNA-bound TOP1 protein amount was equal to 47% (SEM 5.2%) of TOP1 total protein quantity after exposure to CPT11 at CT14 as compared to 35.5% (SEM 1.8%) after exposure at CT28 ( $p=0.05$ ; Figure 4).

### CPT11 molecular PK-PD mathematical model

The CPT11 PK-PD model describes the molecular pathways occurring within a population of quiescent Caco-2 cells exposed to the drug. The modeled biological system consists in one million of Caco-2 cells attached to the bottom of a Petri dish and covered with extracellular medium.  $V_{out}$  stands for the volume of extracellular medium and is set to  $2.5 \cdot 10^{-3}$  L.  $V_{in}$  represents the total intracellular volume equal to the

experimentally-determined volume of a single cell multiplied by the number of cells. It is equal to  $8.10^6$  pL. Mathematical variables represent concentrations in the extracellular compartment or intracellular concentrations averaged on the cell population.

The mathematical model of CPT11 molecular PK-PD computes the cytotoxicity induced in Caco-2 cells by any given exposure schedule. CPT11 activity is assessed by the amount of irreversible DNA/TOP1/SN38 complexes, chosen as the output variable because of its experimentally-proven correlation with CPT11 cytotoxicity ([26], [27]).

Molecular pathways are modeled according to information from literature and experimental results obtained in Caco-2 cells. Briefly, CPT11, SN38 and SN38G cellular uptakes are assumed to be passive as these molecules are mainly under their carboxylate form at the pH of experiments (pH 7.8). Cellular uptake is modeled as a diffusion across a membrane, the contact surface between cells and extracellular medium being proportional to the number of cells ([31]). CPT11 and SN38 efflux are mediated respectively by *ABC\_CPT* (mainly standing for the sum of activities of ABCB1, ABCC1, ABCC2) and *ABC\_SN* (for ABCC1, ABCC2, ABCG2). Efflux follows Michaelis-Menten kinetics ([32,33]). Diffusion from inside to outside of the cells is neglected. CPT11 is bioactivated into SN38 through CES representing the sum of all carboxylesterases activity. This pathway is also modeled by Michaelis-Menten kinetics ([34–36]).

$$\frac{d[CPT_{out}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upCPT}[CPT_{out}] + \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}]} \quad (1)$$

$$\frac{d[CPT_{in}]}{dt} = k_{upCPT}[CPT_{out}] - \frac{V_{effCPT}[ABC\_CPT][CPT_{in}]}{K_{effCPT} + [CPT_{in}]} - \frac{V_{ces}[CES][CPT11_{in}]}{K_{ces} + [CPT11_{in}]} \quad (2)$$

SN38 is expected to be deactivated into SN38G in Caco-2 cells as UGT1A1 was expressed (Figure 3). This reaction is modeled by Michaelis-Menten kinetics ([19, 34, 37]). The mathematical variable UGT stands for the sum of UGT1As enzymatic activities.

$$\frac{d[SN_{out}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upSN}[SN_{out}] + \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{in}]}{K_{effSN} + [SN_{in}]} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[SN_{in}]}{dt} = & k_{upSN}[SN_{out}] - \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{in}]}{K_{effSN} + [SN_{in}]} + \frac{V_{ces}[CES][CPT_{in}]}{K_{ces} + [CPT_{in}]} \\ & - \frac{V_{ugt}[UGT][SN_{in}]}{K_{ugt} + [SN_{in}]} - k_{f2}[DNATOP1][SN38_{in}] + k_{r2}[Compl] \end{aligned} \quad (4)$$

$$(5)$$

As SN38G is inactive, its extra- and intracellular concentrations do not exert any influence on the output of the model which is the drug activity. Nevertheless, those quantities can be computed using the following equations in which transport parameters of SN38G were assumed to be equal to the ones of SN38, for the sake of simplicity:

$$\frac{d[SN_{Gout}]}{dt} \frac{V_{out}}{V_{in}} = -k_{upSN}[SN_{Gout}] + \frac{V_{effG}[ABC\_SN][SN_{Gin}]}{K_{effSN} + [SN_{Gin}]} \quad (6)$$

$$\frac{d[SN_{Gin}]}{dt} = k_{upSN}[SN_{Gout}] - \frac{V_{effSN}[ABC\_SN][SN_{Gin}]}{K_{effSN} + [SN_{Gin}]} + \frac{V_{ugt}[UGT][SN_{in}]}{K_{ugt} + [SN_{in}]} \quad (7)$$

CPT11 ability to bind to TOP1 is neglected so that SN38 is the only molecule able to stabilize DNA/TOP1 complexes into DNA/TOP1/SN38 ones (*Compl*). Those ternary complexes are able to spontaneously dissociate or can be converted into irreversible complexes (*Icompl*) after collision with transcription or replication mechanisms. The  $DNA_{free}$  variable represents the number of available binding sites for TOP1 on the DNA (cf. Supporting Information). Those entry sites are assumed to occur every  $k_{entry}$  pairs of bases. DNA total quantity is considered as constant because Caco-2 cells are quiescent. Therefore the amount of available binding sites can be expressed as:  $DNA_{free} = DNA_{tot} - [DNATOP1] - [Compl] - [Icompl]$ .

$$\frac{d[TOP1]}{dt} = k_{ftop} - k_{dtop}[TOP1] - k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] + k_{r1}[DNATOP1] + k_{r2}[Compl] \quad (8)$$

$$\frac{d[DNATOP1]}{dt} = k_{f1}[TOP1][DNA_{free}] - k_{f2}[DNATOP1][SN_{in}] - k_{r1}[DNATOP1] \quad (9)$$

$$\frac{d[Compl]}{dt} = k_{f2}[DNATOP1][SN_{38in}] - k_{r2}[Compl] - k_{Irr}[Compl] \quad (10)$$

$$\frac{d[Icompl]}{dt} = k_{Irr}[Compl] \quad (11)$$

We consider that the first period of oscillations was artificially perturbed by the serum shock and start the simulation at the second one from which steady oscillations are expected in mRNA and protein amounts. Protein intracellular concentrations are modeled as the result of a constant degradation ( $k_d$ ) and a circadian translation of period  $T$ , the intrinsic one, mean value  $M$ , amplitude  $A$  and phase  $\phi$ .  $T$  is set to the period determined using the mRNA quantifications shown in Figure 3.  $M$  and  $k_d$  are set to 1 such that the mean value of the protein concentration is equal to 1. Those parameter values result in a delay between mRNA and protein amounts approximately equal to 1h30, a duration accounting for protein synthesis in cultured cells. For each gene,  $\phi$  is set to the phase estimated from the corresponding mRNA measurement (Table 1). Thus  $A$  is the only parameter to be estimated for each protein. It is searched in the interval  $[0, 1]$ . This range does not imply any assumption about the protein circadian variation as the amplitude  $A$  can be equal to zero which corresponds to an absence of rhythm. Of note, the modeled protein concentrations only account for functional proteins and can thus be interpreted as protein activities.

$$\frac{d[Protein]}{dt} = M + A \cos\left(\frac{2\pi}{T}(t - \phi)\right) - k_d[Protein] \quad (12)$$

Although *TOP1* mRNA expression displayed robust circadian variations, its nucleic protein level was constant in Caco-2 cells. Therefore no circadian control is assumed on TOP1 protein amount (see equation 8). As experimental transcriptional results showed circadian rhythms for *UGT1A1*, *CES2* and four ABC transporters and as no information is available on corresponding activities, we assume possible circadian variations for glucuronidation (UGT), bioactivation (CES) and efflux of CPT11 (ABC\_CPT) and SN38 (ABC\_SN). Equation 12 is used to model them.



Parameter estimation was performed by a bootstrap approach using experimental results in Caco-2 cells and information from the literature. The first step of the estimation consisted in determining correct search intervals for each parameter, which we did by using unpublished data on Caco-2 cells together with existing information from literature (see Supporting Information). For some parameters (e.g.  $k_{upCPT}$ ), the search interval was very narrow and this first step constituted the essential effort of estimation. The second step consisted in fitting the model to the biological results on CPT11 and SN38 pharmacokinetics (Figure 2) and CPT11 chrono-pharmacodynamics (Figure 4). This was performed by a bootstrap approach in which 50 datasets were generated from the original data. Then the model was fitted to each of these 50 datasets by a least-square approach in which the minimization task was performed by the CMAES algorithm ([38]). We thus got 50 parameter sets from which we computed the mean and standard deviation of each parameter (see Supporting Information for more details about parameter estimation).

When fitting the model to the experimental results of Figure 2, verapamil exposure was assumed to exert an influence only on the parameter  $V_{effCPT}$  which stands for the activity of CPT11 efflux transporters. Therefore all the parameters were assumed to be the same in presence or absence of verapamil except  $V_{effCPT}$  which becomes  $V_{effCPTvera}$  (Table 2).

The parameter estimation provided a value for CES circadian amplitude which was by far larger than that of all other proteins. The amplitude of CES was actually greater than that of UGT,  $ABC\_CPT$ , and  $ABC\_SN$  in all the 50 parameter sets computed by the bootstrap approach (Table 2). The standard deviations of  $A_{UGT}$ ,  $A_{ABC\_CPT}$  and  $A_{ABC\_SN}$  were in the same range as the parameter values which suggested that experimental data could still be fitted by the model even if those circadian amplitudes were close to zero (Table 2). This prefigured a weak influence of those protein circadian rhythms on CPT11 chronotoxicity in Caco-2 cells.

## Theoretical optimization of CPT11 exposure

For therapeutics optimization, well-synchronized Caco-2 cells were considered as healthy cells whereas non-synchronized cells represented cancer cells since circadian organization is often disturbed in tumor tissues ([8], [39]). Mathematically, healthy and cancer cells were simulated using the same mathematical

model of CPT11 PK-PD. Parameter values were the same except for circadian amplitudes  $A$  which were set to zero for tumor cells.

The considered exposure schemes consisted in an administration of CPT11 at a particular initial concentration, starting at a particular CT, over a duration ranging from 1 to 27 h. The cumulative dose is here defined as the initial concentration of CPT11 multiplied by the exposure duration. We chose such schemes because they are easily reproducible in cell culture. CPT11 remained in the blood of cancer patients over approximately 24h at a concentration ranging from 0 to 20  $\mu\text{M}$  ([8]). Therefore, we investigated cumulative doses ranging from 0 to 1440  $\mu\text{M.h}$  which corresponded to an exposure to 0 to 60  $\mu\text{M}$  of CPT11 over 24 h. The optimization procedures which follow consisted in determining the optimal values of the cumulative dose, the CT at which the exposure started and its duration.

### **Maximizing efficacy without toxicity constraint**

We firstly only considered cancer cells and aimed at maximizing efficacy without taking into account CPT11 toxicity on the healthy cell population. As tumor cells are not synchronized, the CT of exposure has no influence. We therefore looked for optimal values of the cumulative dose and the exposure duration which induced the largest DNA damage. Mathematically, this damage was assessed by the value of the variable  $I_{compl}$  at the end of the exposure. It was computed for a cumulative dose ranging from 0 to 1440  $\mu\text{M.h}$  and an exposure duration between 1 and 27 h (Fig.5). For all the considered cumulative doses, optimal durations ranged from 1h50 to 7h40 and increased with the dose. As expected, the maximum efficacy for a given cumulative dose increased with the cumulative dose.

### **Minimizing toxicity without efficacy constraint**

We then only considered healthy cells and aimed at minimizing toxicity without any constraint of minimum efficacy. Toxicity was here assessed by the value of DNA damage  $I_{compl}$  in the normal cell population, at the end of the exposure. The cumulative dose of CPT11, the CT at which the exposure started and its duration were the three parameters considered here. To study the influence of the CT and the exposure duration, we set the cumulative dose to 500  $\mu\text{M.h}$  as an example, the following features remaining true for all cumulative doses ranging from 0 to 1440  $\mu\text{M.h}$ . Toxicity was computed for an exposure duration between 1 and 27 h, and a CT of exposure ranging from CT0 to CT54, which



corresponded to two periods (Fig. 6).

For any exposure duration, the best tolerated scheme was obtained by starting CPT11 administration between CT2 and CT3. This time interval corresponded to 1 to 2 h before the nadir of CES protein amount (Fig.6, 7 A). The most toxic scheme was achieved when CPT11 was administered at CT21 over the exposure duration which also induced the largest DNA damage in cancer cells (4 h for the dose of 500  $\mu$  M.h). This most toxic duration displayed the largest circadian amplitude in terms of DNA damage induced in healthy cells. CT21 did not correspond exactly to the peak of CES protein amount but was rather the optimal balance between high CES protein amount and low UGT, ABC\_CPT and ABC\_SN ones.

### Maximizing efficacy under a constraint of minimal toxicity

Finally, in the perspective of control theory ([40]), we adopted the therapeutics strategy of maximizing DNA damage on cancer cells under the constraint of DNA damage on healthy cells not exceeding a tolerability threshold. In a clinical point of view, this threshold represents the maximum toxicity that the patient can handle and may vary according to gender, genetic background or previous treatments. Healthy and cancer cells were numerically exposed to the same drug schedule mimicking the *in vivo* situation in which healthy and tumor tissues are exposed to the same blood concentrations.

The optimization procedures consisted in determining the optimal values of the cumulative dose, the CT at which the exposure started and its duration. Concerning the numerical algorithm, a cost function was minimized to determine optimal schemes for each value of the tolerability threshold. This function was the sum of two terms: the first one was the opposite of DNA damage  $I_{compl}$  in cancer cells, the second one was the toxicity constraint which took the form of an *If* statement equal to 0 if  $I_{compl}$  in healthy cells was below the toxicity threshold and  $10^3$  otherwise. The weight on the constraint was intentionally very high in order to unconditionally maintain the toxicity under the threshold. The algorithm CMAES was used to minimize the cost function. It was preferred to Matlab function *fmincon* as it was able to handle the large discontinuities of the cost function due to the constraint. We investigated tolerability thresholds ranging from 0.01 to 0.04 nM of SN38 bound to DNA which corresponded to the studied range of cumulative doses.

Computed optimal cumulative doses of CPT11 ranged from 241 to 1321  $\mu$  M.h and increased with the tolerability threshold. For any dose, the optimal scheme consisted in administering CPT11 over 3h40 to 7h10 starting between CT2h10 and CT2h30 which corresponded to 1h30 to 1h50 before the nadir of CES protein amount (Fig. 7). The optimal schemes were not centered on the nadir of CES rhythm but rather extended after it, when UGT, ABC\_CPT and ABC\_SN amounts were higher and therefore protected more efficiently healthy cells. For any maximum allowed toxicity, the optimal duration did not exceed 7h10 highlighting the need of short exposure durations to optimally exploit the temporal difference between healthy and cancer cells. Regarding efficacy, those optimal schemes induced twice more DNA damage in cancer cells than in healthy ones.

## Discussion

We gave evidence for a circadian organization in Caco-2 cells resulting in rhythms in CPT11 PD. A mathematical model of CPT11 molecular PK-PD was designed, fitted to experimental results and used for therapeutics optimization. It concluded that any dose of CPT11 should be optimally administered over a duration of 3h15 to 7h10, starting between 1h30 and 1h50 before the nadir of CPT11 bioactivation rhythm.

A clinical interpretation of the optimal therapeutics strategies presented in this *in vitro* study can be obtained by rescaling the period from 27 h, that of Caco-2 cells, to 24 h. It thus suggests to administer CPT11 such that it remains over an active concentration in the patient blood during 3h30 to 6h30, starting between 1h20 and 1h40 before the nadir of the patient's circadian rhythm of CESs. In cancer patients, a dumbbell delivery scheme over 6h resulted in CPT11 circulating during approximately 12 h ([8]). The present study thus suggests to reduce the duration of CPT11 infusion which may enhance efficacy. This might also lead to a decrease in the total administered dose in order to achieve acceptable tolerability.

SN38 was detected in Caco-2 cells which is in agreement with the fact that CES2 was expressed. Its efflux was not influenced by verapamil suggesting a weak activity of the inhibitor on transporters responsible for SN38 efflux. Indeed, ABCG2 for which SN38 is a good substrate, is poorly inhibited by verapamil ([41]). Another possibility is that SN38 efflux was not mediated by active transporters, the

highly lipophilic molecules of SN38 diffusing passively across the cell membrane.

CPT11 is converted by cytochromes P450 3A4/3A5 into two metabolites: APC and NPC ([16]). Those pathways were not taken into account as they are reported to be inactive in most Caco-2 cell lines ([42]). Nevertheless verapamil inhibits cytochrome P450 3A ([43]) and the drastic increase of CPT11 intracellular concentration in the presence of verapamil could be explained by the decrease in CPT11 conversion into APC and NPC.

Only 0.1% of CPT11 dose was bioactivated into SN38 in Caco-2 cells (Figure 2). Our data suggest that the remaining 99.9% exerted weak cytotoxicity as described in the literature ([17]). Indeed verapamil exposure of Caco-2 cells resulted in a 10-fold increase in the intracellular concentration of CPT11 without any change in that of SN38. In contrast with those large pharmacokinetics differences, the average percentage of surviving cells after exposure to verapamil and CPT11 was only reduced by 11.6% relative to that measured when cells were exposed to CPT11 alone. In the light of those experimental results, it seemed justified to neglect CPT11 activity in the current mathematical model.

The protein degradation (i.e.  $k_d$ ) was assumed to be constant as no biological data were available regarding its circadian variations for each considered enzyme. However, this assumption must be tempered since circadian changes could modulate the phosphorylation processes occurring upstream of protein degradation ([44]).

The mathematical model predicted that CPT11 bioactivation through CES was the main determinant of CPT11 PD circadian rhythm. Even though the circadian amplitude of *CES2* mRNA expression was the lowest among all measured genes, its protein amount and activity could be highly rhythmic. Indeed CES1 protein level displayed robust circadian variations in the colon mucosa of two mouse strains despite low amplitude of the circadian variations of its mRNA level ([2]). Nevertheless, the 1h30-delay between mRNA and protein expression assumed in the mathematical model might be underestimated ([45]) and UGT1A1 or ABC transporters may have been determinant for CPT11 PD rhythm. However this hypothesis was not favored as the shifts between their mRNA and protein expressions must have exceeded ten hours to be relevant.

Here, a realistic interval of values was determined for each parameter. Thus our mathematical model constitutes a reasonable tool to explore therapeutics optimization in the perspective of clinical applications. However, more biological information is needed to determine precise values of all parameters in the Caco-2 cell line and therefore be able to predict its quantitative response to CPT11.

CPT11 activity was assessed by the amount of irreversible CPT11/TOP1/DNA complexes. Those complexes trigger DNA repair and possibly lead to apoptosis ([46]). Many repair enzymes as well as proteins involved in the apoptotic machinery such as p53, the pro-apoptotic BAX or the anti-apoptotic BCL-2 display circadian rhythms which may influence CPT11 chronotoxicity ([2, 47–49]). Therefore DNA repair and apoptosis enzymes should both be studied in Caco-2 cells and included in an extended version of the mathematical model.

In the current model we differentiated cancer cells from healthy ones by their lack of circadian entrainment. The proliferation rate constitutes another important difference which was not considered here as we studied quiescent cells. Our mathematical model has been supplemented with a circadian entrained cell cycle model in order to optimize CPT11 exposure in proliferating cells ([50]).

This study on cell populations is being further integrated into a whole-body physiologically-based PK-PD model which aims at investigating molecular differences between experimentally-determined chronotoxicity mouse classes and designing optimal administration schemes for each of them ([2]). This prefigures the part of mathematical modeling in the determination of patient classes characterized by molecular biomarkers according to which the circadian delivery would be tailored. In the case of colorectal cancer, patients often undergo surgery after which tumor and healthy cells can be collected and analyzed at the molecular level ([36, 51]). The whole body mathematical model could then be fitted to the patient molecular profile and provide a tailored chronomodulated administration scheme.

## Materials and methods

### Cell Culture

The Caco-2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s: Ham F12 medium (1:1) supplemented with penicillin (100

U/L), streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), glutamine (2 mM) (Fischer Scientific, Paris, France) and 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Dutscher, Paris, France). They were maintained in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ . Experiments were performed four days after confluence. CPT11 was purchased from Pfizer (Paris, France). For transport inhibition studies, non-synchronized cells were pre-incubated with verapamil, a non specific inhibitor of ABC transporters (100  $\mu\text{M}$  for 24 h; Sigma Aldrich, Paris, France) ([52]). Cells were then exposed to CPT11 (115  $\mu\text{M}$ ) during 48 h. Cell synchronization was performed by a serum shock which consisted in a 2-hour exposure to serum rich medium (DMEM:F12 containing 50 % FBS). The beginning of the serum shock defined Circadian Time 0 (CT 0).

## RNA quantification

Circadian gene expressions were estimated using quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). Cells were scraped at different CTs in guanidine isothiocyanate and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until RNA extraction performed as described in [53]. Reverse transcription was achieved with Superscript II RT (Invitrogen, Paris, France). Quantitative PCRs were performed with LightCycler 480 using LightCycler 480 SYBR Green I master kit (Roche, Meylan, France). Relative quantification of target RNA using 36B4 as reference was performed with Relquant software (Roche, Meylan, France).

## CPT11 lactone-carboxylate Equilibrium

CPT11 mother solution being at pH 4.4, CPT11 underwent a transformation from its lactone to carboxylate form when it was added to the culture medium at pH 7.8. In order to assess the duration of this reaction, we built a mathematical model and fitted it to data from [54] (cf. Supporting Information). In our experimental conditions the model predicted that the lactone/carboxylate equilibrium was reached within 3 h. The culture medium containing CPT11 was therefore prepared more than 3 h before incubation with cells.

## Drug concentration measurement

CPT11 and SN38 extra- and intracellular concentrations were measured by a method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) adapted from [55]. After cell exposure, extracellular medium was sampled. The cell layers were rinsed with Phosphate Buffer Saline (PBS), recovered by scraping

and pelleted in 1 mL of PBS. Cells were then centrifuged. Cell pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of water supplemented with 200  $\mu$ L of methanol/acetonitrile (50/50 v/v) containing 1% HCl. Cells were centrifuged again and the supernatant containing drugs was sampled. 70  $\mu$ L was diluted by adding 30  $\mu$ L of water and spiked onto the column. Extracellular samples were diluted ten times, pretreated with acetonitrile 1% trifluoroacetic acid and centrifuged before injection. Separation was carried out on a C-18 reversed-phase column (Interchim, Montlucon, France) with a mobile phase consisting of a mixture of water, acidified acetonitrile (0.005% of trifluoroacetic acid) and methanol (50:38:12, v/v/v). This mobile phase was delivered isocratically at a flow rate of 0.6 mL/min with a P680 pump (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). Fluorometric detection was carried out with excitation and emission wavelengths set at 380 and 532 nm respectively, using the RF-2000 detector (Dionex Corporation). Peaks were quantified by reference to a standard calibration curve obtained by spiking known amounts of drugs (CPT11 (0.001-0.1 mg/mL) and SN38 ( $5.10^{-5}$  –  $5.10^{-2}$  mg/mL)), using WinNonLin Pro software (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). The values obtained from HPLC measurement were normalized to one million cells (cf. Supporting Information).

## TOP1 activity

The Topo I Link Kit (TopoGen, Port Orange, FL) was used to quantify the amount of TOP1 linked on DNA ([56]). The cells were lysed with 3 mL lysis buffer. Cell lysates were loaded at the top of a cesium chloride gradient and centrifuged at 100,000 g for 16 h at 20°C. Fractions of 400  $\mu$ L were removed from the top of the gradient, and an aliquot of each fraction (10  $\mu$ L) was diluted (1/5) and quantified at 260 nm with spectrophotometer (Eppendorf, Paris, France). In parallel, another aliquot of each fraction (50  $\mu$ L) was diluted with an equal volume of 25 mM sodium phosphate buffer and loaded onto a nitrocellulose membrane (Perbio, Paris, France) using a slot-blot device. TOP1 was revealed in the slots with the immunoblotting technique described in the TopoGen kit using ProteinA-peroxidase (1/5000, Sigma Aldrich, Paris, France) to replace secondary antibody. A signal was seen in two different groups of slots: those not containing DNA (free TOP1, top of the gradient) and those containing DNA (DNA/TOP1 complexes, bottom of the gradient). Chemoluminescence signals were detected with Las4000 camera and quantified with ImageJ software. For circadian assessment of TOP1 complexes after CPT11 exposure cells were exposed during 30 min at 50  $\mu$ M at indicated CT. The software SPSS (IBM, Somers, NY) was used for the Anova test (univariate general linear model).



## Gene expression mathematical model

Circadian gene expressions in synchronized Caco-2 cells were modeled as a damped cosine:

$$RNA(t) = R + e^{-\lambda t}(P + S \cos(\frac{2\pi}{T}(t - \phi))) \quad (13)$$

The damping factor  $e^{-\lambda t}$  was both applied to the cosine to represent cell desynchronization over time and to  $P$  to model the initial overexpression of genes due to the serum shock. Both dampening exponents were assumed to be equal for the sake of simplicity.  $R$  represented the mRNA value before the serum shock towards which the model converges in long time. All genes were assumed to oscillate with the same period which was the cell population intrinsic one. This common period  $T$  and gene parameters  $R$ ,  $\lambda$ ,  $P$ ,  $S$ , and  $\phi$  were estimated simultaneously for all genes using a bootstrap approach to fit experimental results of Figure 3 (cf. Supporting Information).

## Minimization algorithms

Matlab function *fmincon* and the *CMAES* algorithm ([38]) were used for minimization tasks in parameter estimations and optimization procedures.

## Acknowledgments

## References

1. Giacchetti S, Bjarnason G, Garufi C, Genet D, Iacobelli S, et al. (2006) Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol* 24(22):3562-9.
2. Ahowesso C (2011) Approche expérimentale de la personnalisation de la chronothérapie par irinotecan, PhD thesis, Université Paris 11.
3. Chau I, Cunningham D (2009) Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how?. *Br J Cancer* 100(11):1704-19.

4. Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, et al. (1997) Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1383-8.
5. Granda TG, D'Attino RM, Filipski E, Vrignaud P, Garufi C, et al. (2002) Circadian optimisation of irinotecan and oxaliplatin efficacy in mice with Glasgow osteosarcoma. *Br J Cancer* 86(6):999-1005.
6. Garufi C, Vanni B, Aschelter AM, Zappala AR, Bria E, et al. (2006) Randomised phase II study of standard versus chronomodulated CPT11 plus chronomodulated 5-fluorouracil and folinic acid in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 42(5):608-16.
7. Gholam D, Giacchetti S, Brezault-Bonnet C, Bouchahda M, Hauteville D, et al. (2006) Chronomodulated irinotecan, oxaliplatin, and leucovorin-modulated 5-Fluorouracil as ambulatory salvage therapy in patients with irinotecan- and oxaliplatin-resistant metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 11(10):1072-80.
8. Levi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:377-421.
9. Levi F, Schibler U (2007) Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:593-628.
10. Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* 14(24):2289-95.
11. Carr AJ, Whitmore D (2005) Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol* 7(3):319-21.
12. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93(6):929-37.
13. Izumo M, Sato TR, Straume M, Johnson CH (2006) Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput Biol* 2(10):e136.
14. Brown SA, Zumberg G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* 12(18):1574-83.



15. Pardini L, Kaeffer B, Trubuil A, Bourreille A, Galmiche JP (2005) Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol Int* 22(6):951-61.
16. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, et al. (2001) Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT11). *Clin Cancer Res* 7(8):2182-94.
17. Rivory LP, Robert J (1995) Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S)camptothecin and its derivatives. *Pharmacol Ther* 68(2):269-96.
18. Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y, Sawada J (2001) Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica* 31(10):687-99.
19. Tallman MN, Ritter JK, Smith PC (2005) Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab Dispos* 33(7):977-83.
20. Kobayashi K, Bouscarel B, Matsuzaki Y, Ceryak S, Kudoh S, et al. (1999) pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN38, by intestinal cells. *Int J Cancer* 83(4):491-6.
21. Itoh T, Itagaki S, Sumi Y, Hirano T, Takemoto I, et al. (2005) Uptake of irinotecan metabolite SN38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother Pharmacol* 55(5):420-4.
22. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A (2006) Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro* 20(2):163-75.
23. Lalloo AK, Luo FR, Guo A, Paranjpe PV, Lee SH, et al. (2004) Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC Med* 2:16.
24. Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6(10):789-802.
25. Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y (2003) Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3(4):271-90.

•

26. Goldwasser F, Bae I, Valenti M, Torres K, Pommier Y (1995) Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res* 55(10):2116-21.
27. Subramanian D, Kraut E, Staubus A, Young DC, Muller MT (1995) Analysis of topoisomerase I/DNA complexes in patients administered topotecan. *Cancer Res* 55(10):2097-103.
28. Kuramoto Y, Hata K, Koyanagi S, Ohdo S, Shimeno H, et al. (2006) Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 71(8):1155-61.
29. Ando H, Yanagihara H, Sugimoto K, Hayashi Y, Tsuruoka S, et al. (2005) Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiol Int* 22(4):655-65.
30. Okyar A, Filipski E, Dulong S, Ahowesso C, Li X, et al. (2009) Rhythmic intestinal drug elimination via ABC transporters: a potential determinant of anticancer drugs chronopharmacology. Presented at Congr. Eur.Biol. Rhythm Soc., 11th, Strasbourg, France
31. Bassingthwaite JB, Goresky CA (1984) Modeling in the analysis of solute and water exchange in the microvasculature. In: *HandBook of Physiology* pp. 560-570.
32. Tabas LB, Dantzig AH (2002) A high-throughput assay for measurement of multidrug resistance protein-mediated transport of leukotriene C4 into membrane vesicles. *Anal Biochem* 310(1):61-6.
33. Woebking B, Reuter G, Shilling RA, Velamakanni S, Shahi S, et al. (2005) Drug-lipid A interactions on the Escherichia coli ABC transporter MsbA. *J Bacteriol* 187(18):6363-9.
34. Yang XX, Hu ZP, Xu AL, Duan W, Zhu YZ, et al. (2006) A mechanistic study on reduced toxicity of irinotecan by coadministered thalidomide, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 319(1):82-104.
35. Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM (1996) Conversion of irinotecan (CPT11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol* 52(7):1103-11.
36. Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, et al. (2006) The in vitro metabolism of irinotecan (CPT11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. *Br J Clin Pharmacol* 62(1):122-9.

37. Gagné JF, Montminy V, Belanger P, Journault K, Gaucher G, et al. (2002) Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 62(3):608-17.
38. Hansen, N (2006) The CMA evolution strategy: a comparing review. Towards a new evolutionary computation. *Advances on estimation of distribution algorithms*. Springer 75-102.
39. Levi F, Altinok A, Clairambault J, Goldbeter A (2008) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 366(1880):3575-98.
40. Basdevant C, Clairambault J, Levi F (2005) Optimisation of time-scheduled regimen for anti-cancer drug infusion. *ESAIM:M2AN* 39(6):1069-1086.
41. Henrich CJ, Bokesch HR, Dean M, Bates SE, Robey RW, et al. (2006) A high-throughput cell-based assay for inhibitors of ABCG2 activity. *J Biomol Screen* 11(2):176-83.
42. Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, et al. (2008) Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci* 35(5):383-96.
43. Lemma GL, Wang Z, Hamman MA, Zaheer NA, Gorski JC, et al. (2006) The effect of short- and long-term administration of verapamil on the disposition of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein substrates. *Clin Pharmacol Ther* 79(3):218-30.
44. Reischl S, Kramer A (2011) *FEBS Lett*. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. Epub ahead of print.
45. Porsin B, Formento JL, Filipski E, Etienne MC, Francoual M, et al. (2003) Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *Eur J Cancer* 39(6):822-8.
46. Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, Sordet O, Jobson AG, et al. (2006) Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81:179-229.
47. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, Reardon JT, Lee JH, et al. (2010) Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett* 584(12):2618-25.

48. Bjarnason GA, Jordan R (2002) Rhythms in human gastrointestinal mucosa and skin. *Chronobiol Int* 19(1):129-40.
49. Granda TG, Liu XH, Smaaland R, Cermakian N, Filipski E, et al. (2005) Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *FASEB J* 19(2):304-6.
50. De Maria E, Fages F, Soliman S (2009) On Coupling Models Using Model-Checking: Effects of Irinotecan Injections on the Mammalian Cell Cycle. *Lecture Notes in Computer Science* 5688:142-157.
51. Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreau P, et al. (1999) CPT11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 80(3-4):364-70.
52. May K, Minarikova V, Linnemann K, Zygmunt M, Kroemer HK, et al. (2008) Role of the multidrug transporter proteins ABCB1 and ABCC2 in the diaplacental transport of talinolol in the term human placenta. *Drug Metab Dispos* 36(4):740-4.
53. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1(2):581-5.
54. Akimoto K, Kawai A, Ohya K (1994) Kinetic studies of the hydrolysis and lactonization of camptothecin and its derivatives, CPT11 and SN38, in aqueous solution. *Chem Pharm Bull* 42(10):2135-2138.
55. Rivory LP, Robert J (1994) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the carboxylate and lactone forms of the camptothecin derivative irinotecan, CPT11, and its metabolite SN38 in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661(1):133-41.
56. Pavillard V, Agostini C, Richard S, Charasson V, Montaudon D, et al. (2002) Determinants of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;49(4):329-35.

## Figure Legends

**Figure 1. CPT11 PK-PD molecular pathways considered in Caco-2 cells.** CPT11 in the extracellular medium ( $CPT_{out}$ ) diffuses passively through the cell membrane and reaches the intracellular compartment ( $CPT_{in}$ ). It is then bioactivated into SN38 ( $SN_{in}$ ) through CESs.  $SN_{in}$  is deactivated into SN38G ( $SNG_{in}$ ) through UGT1As.  $CPT_{in}$ ,  $SN_{in}$  and  $SNG_{in}$  are expelled outside of the cell by ABC transporters ( $CPT_{out}$ ,  $SN_{out}$ ,  $SNG_{out}$ ).  $TOP1$  is an enzyme which relaxes supercoiled DNA by creating transient *DNA/TOP1 complexes*.  $SN_{in}$  traps them into SN38/DNA/TOP1 *reversible complexes* which becomes irreversible after collision with replication or transcription mechanisms, thus triggering DNA repair and possibly apoptosis.

**Figure 2. Time evolution of CPT11, SN38 and SN38G extra- and intracellular concentrations during CPT11 exposure** Drug concentrations in absence (○) or presence (■) of verapamil are averages of four data points obtained from two independent experiments ( $\pm$  SEM). Solid and dashed curves are the best fits of the PK-PD mathematical model in absence or presence of verapamil respectively. **A,B,C:** extracellular concentrations of CPT11, SN38 and SN38G; **D, E, F:** intracellular concentrations of CPT11, SN38 and SN38G (sum of free and DNA-bound molecules).

**Figure 3. Gene expression circadian rhythm in synchronized Caco-2 cells** mRNA level of three clock genes ( $REV-ERB\alpha$ ,  $PER2$ ,  $BMAL1$ ) and seven genes involved in CPT11 PK-PD ( $TOP1$ ,  $UGT1A1$ ,  $CES2$ ,  $ABCB1$ ,  $ABCC1$ ,  $ABCC2$ ,  $ABCG2$ ) displayed circadian variations. Experimental results are averages of four independent experiments for  $REV-ERB\alpha$ ,  $TOP1$ ,  $UGT1A1$ , and  $CES2$ ; and three independent experiments for  $PER2$ ,  $BMAL1$ ,  $ABCB1$ ,  $ABCC1$ ,  $ABCC2$ , and  $ABCG2$  (mean  $\pm$  SEM). The solid curve is the best fit of equation 13 (see Table 1 for parameter values).

**Figure 4. Circadian rhythm of CPT11-induced TOP1 complexes on DNA in synchronized Caco-2 cells** Experimental results are averages of four independent experiments ( $\pm$  SEM) after exposure to CPT11 at CT14 and CT28. The dotted line is the circadian variation of TOP1 complexes (sum of variables  $DNATOP1$ ,  $Compl$  and  $Icompl$ ) computed using the PK-PD mathematical model fitted to all experimental data (see Results).

**Figure 5. Mathematical optimization of CPT11 exposure in non-synchronized Caco-2 cells.** Efficacy in non-synchronized cells with respect to the cumulative dose and the exposure duration. White dots are the most efficient duration for each cumulative dose.

**Figure 6. Mathematical optimization of CPT11 exposure in synchronized Caco-2 cells.** Toxicity in synchronized cells with respect to exposure duration and CT of beginning of exposure. The cumulative dose was set to  $500\mu\text{M.h}$ .

**Figure 7. Maximizing CPT11 efficacy under a constraint of tolerability.** **A:** Simulated circadian rhythm of CES (green), UGT (blue), ABC\_CPT (red) and ABC\_SN (orange) protein amounts in healthy cells. **B:** Optimal exposure schemes following the strategy of maximizing efficacy under a constraint of maximal allowed toxicity. Optimal schemes consisted in administering the optimal cumulative dose (written in green) over 3h40 to 7h10, starting between 1h30 and 1h50 before the nadir of CES protein amount. Schemes were not centered on the nadir but rather extended after it when UGT, ABC\_CPT and ABC\_SN amounts were higher and protected more efficiently healthy cells.

## Tables

	$\lambda$ (h <sup>-1</sup> )	$P$ (a.u.)	$S$ (a.u.)	$\phi$ (h, min)	$R$ (a.u.)
<i>REV</i> – <i>ERB</i> $\alpha$	$0.04 \pm 0.01$	$0.21 \pm 0.06$	$0.24 \pm 0.05$	10 h 41 $\pm$ 71 min	$0.14 \pm 0.03$
<i>PER2</i>	$0.08 \pm 0.01$	$0.83 \pm 0.52$	$1.65 \pm 0.5$	8 h 37 $\pm$ 74 min	$0.79 \pm 0.18$
<i>BMAL1</i>	0	$0.83 \pm 0.07$	$0.41 \pm 0.09$	17 h 04 $\pm$ 75 min	0
<i>TOP1</i>	$0.02 \pm 0.01$	$0.7 \pm 0.2$	$0.59 \pm 0.15$	14 h 30 $\pm$ 96 min	$0.41 \pm 0.11$
<i>UGT1A1</i>	$0.06 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.13$	$0.68 \pm 0.16$	14 h 32 $\pm$ 65 min	$0.27 \pm 0.06$
<i>CES2</i>	0	$0.87 \pm 0.04$	$0.13 \pm 0.05$	16 h 40 $\pm$ 176 min	0
<i>ABCB1</i>	$0.03 \pm 0.01$	$1.06 \pm 0.24$	$0.84 \pm 0.3$	15 h 58 $\pm$ 60 min	$0.09 \pm 0.08$
<i>ABCC1</i>	$0.06 \pm 0.02$	$0.17 \pm 0.09$	$0.18 \pm 0.07$	10 h 28 $\pm$ 144 min	$0.25 \pm 0.05$
<i>ABCC2</i>	$0.08 \pm 0.004$	$1.44 \pm 0.27$	$1.32 \pm 0.23$	14 h 50 $\pm$ 51 min	$0.36 \pm 0.05$
<i>ABCG2</i>	$0.08 \pm 0.007$	$0.63 \pm 0.13$	$0.69 \pm 0.12$	13 h 36 $\pm$ 43 min	$0.09 \pm 0.02$

**Table 1. Parameter values of circadian mRNA expressions in synchronized Caco-2 cells, mean  $\pm$  SD estimated by fitting equation 13 to experimental data, a.u.= arbitrary units**

Reaction	Symbol	Value
CPT11 uptake speed	$k_{upCPT}$	$3.64 \pm 0.53$ h <sup>-1</sup>
CPT11 efflux	$V_{effCPT}$ $K_{effCPT}$	$594.35 \pm 116.64$ h <sup>-1</sup> $57.72 \pm 17.85$ $\mu$ M
CPT11 efflux in presence of verapamil	$V_{effCPTvera}$	$409.3 \pm 66.09$ h <sup>-1</sup>
CPT11 activation	$V_{ces}$ $K_{ces}$	$1.9 \pm 0.51$ h <sup>-1</sup> $147.34 \pm 34.98$ $\mu$ M
SN38 uptake	$k_{upSN}$	$27.01 \pm 4.73$ h <sup>-1</sup>
SN38 efflux	$V_{effSN}$ $K_{effSN}$	$161.18 \pm 46.24$ h <sup>-1</sup> $1.28 \pm 0.57$ $\mu$ M
SN38 glucuronidation	$V_{ugt}$ $K_{ugt}$	$65.59 \pm 23.25$ h <sup>-1</sup> $2.69 \pm 0.9$ $\mu$ M
DNATOP1 complex formation	$k_{f1}$	$0.75 \pm 0.21$ $\mu$ M <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
DNATOP1 complex dissociation	$k_{r1}$	$118.33 \pm 35.12$ h <sup>-1</sup>
DNA/TOP1/SN38 complex formation	$k_{f2}$	$2432.42 \pm 967.28$ $\mu$ M <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
DNA/TOP1/SN38 complex dissociation	$k_{r2}$	$2.56 \pm 0.77$ h <sup>-1</sup>
Irreversible complex formation	$k_{Irr}$	$0.0035 \pm 0.0025$ h <sup>-1</sup>
Entry sites on DNA for TOP1 binding	$k_{entry}$	$10.42 \pm 3.1$ pairs of bases
TOP1 protein formation	$k_{ftop}$	$0.018 \pm 0.009$ $\mu$ M.h <sup>-1</sup>
Amplitude of CPT11 bioactivation circadian rhythm	$A_{CES}$	$0.9 \pm 0.09$ $\mu$ M.h <sup>-1</sup>
Amplitude of CPT11 efflux circadian rhythm	$A_{ABC.CPT}$	$0.37 \pm 0.32$ $\mu$ M.h <sup>-1</sup>
Amplitude of SN38 efflux circadian rhythm	$A_{ABC.SN}$	$0.22 \pm 0.18$ $\mu$ M.h <sup>-1</sup>
Amplitude of SN38 glucuronidation circadian rhythm	$A_{UGT}$	$0.45 \pm 0.31$ $\mu$ M.h <sup>-1</sup>

**Table 2. Parameters of the CPT11 molecular PK-PD model, mean  $\pm$  SD estimated by fitting experimental data (see Results and Supporting Information)**

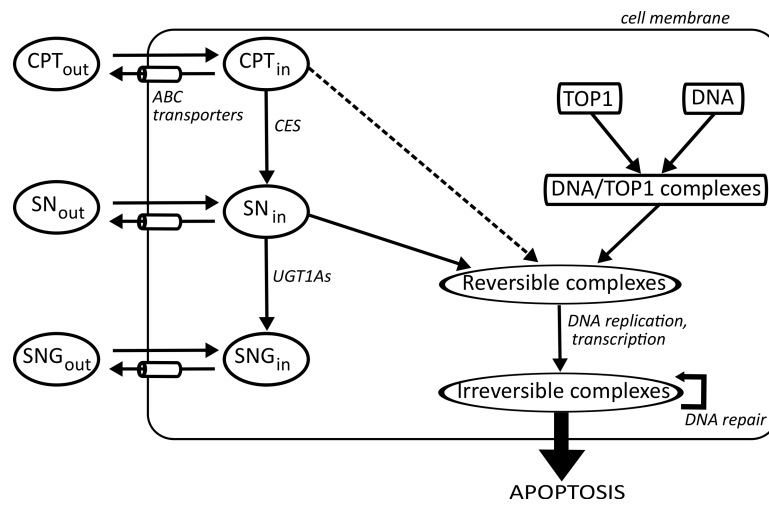


Figure 1



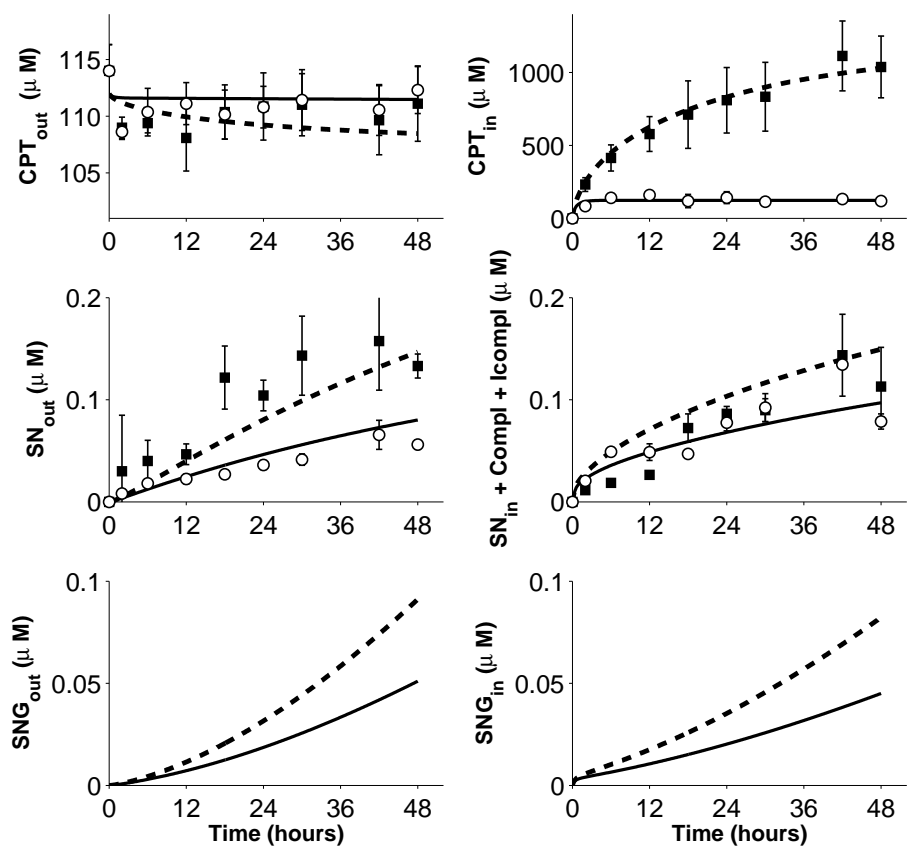


Figure 2

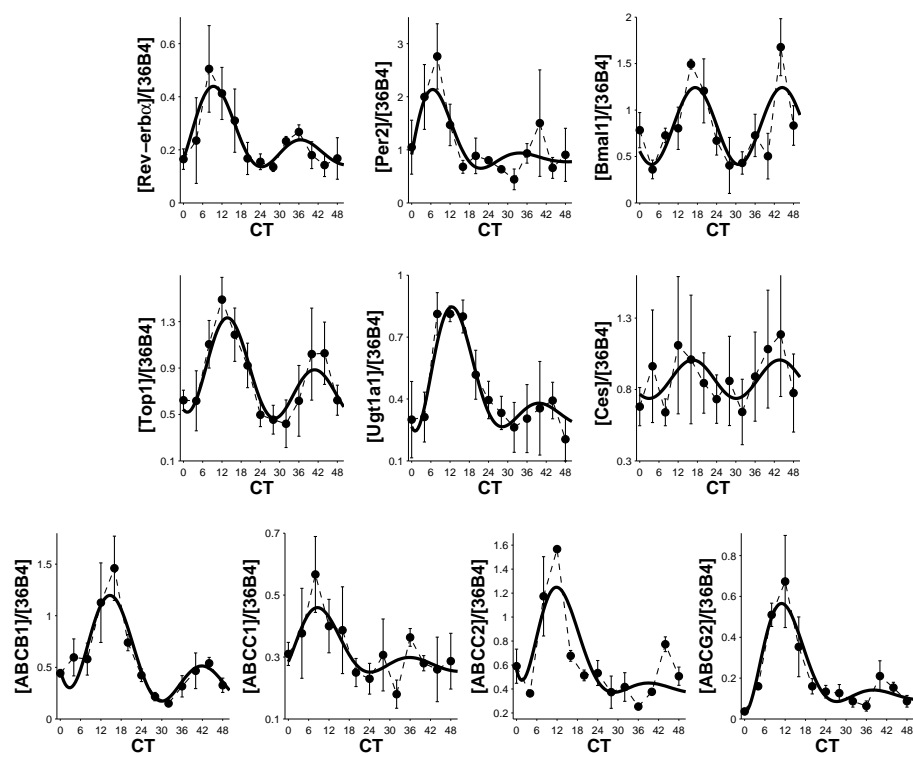


Figure 3

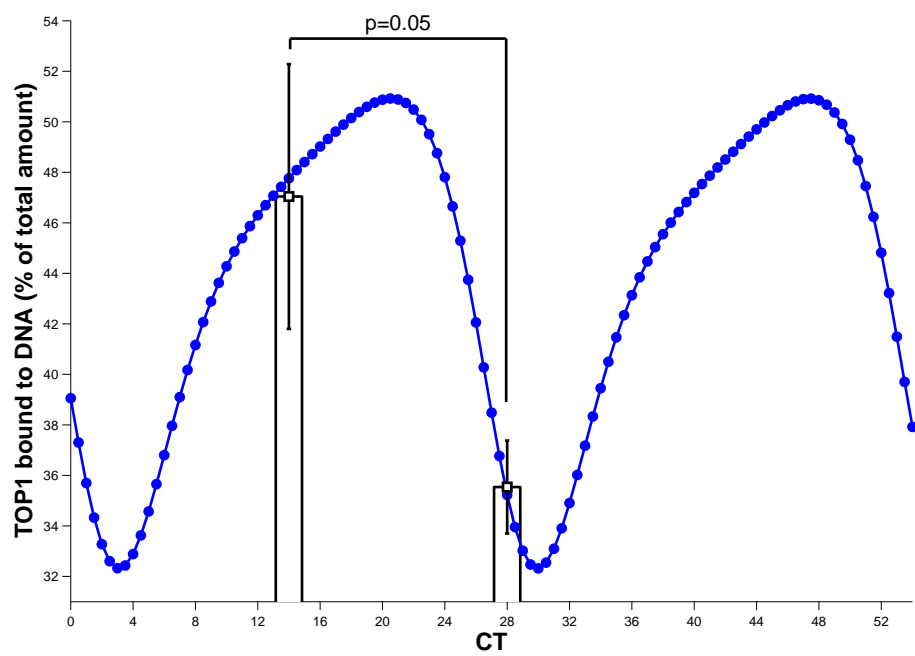


Figure 4

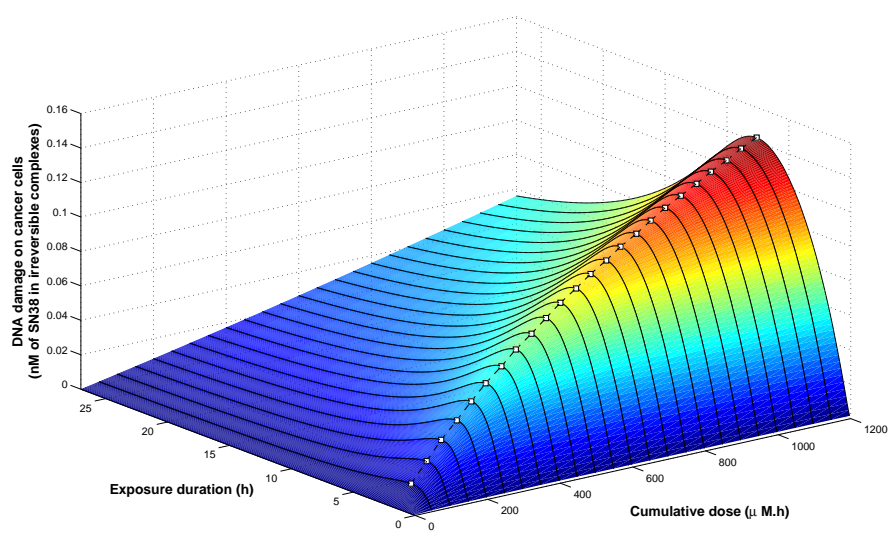


Figure 5

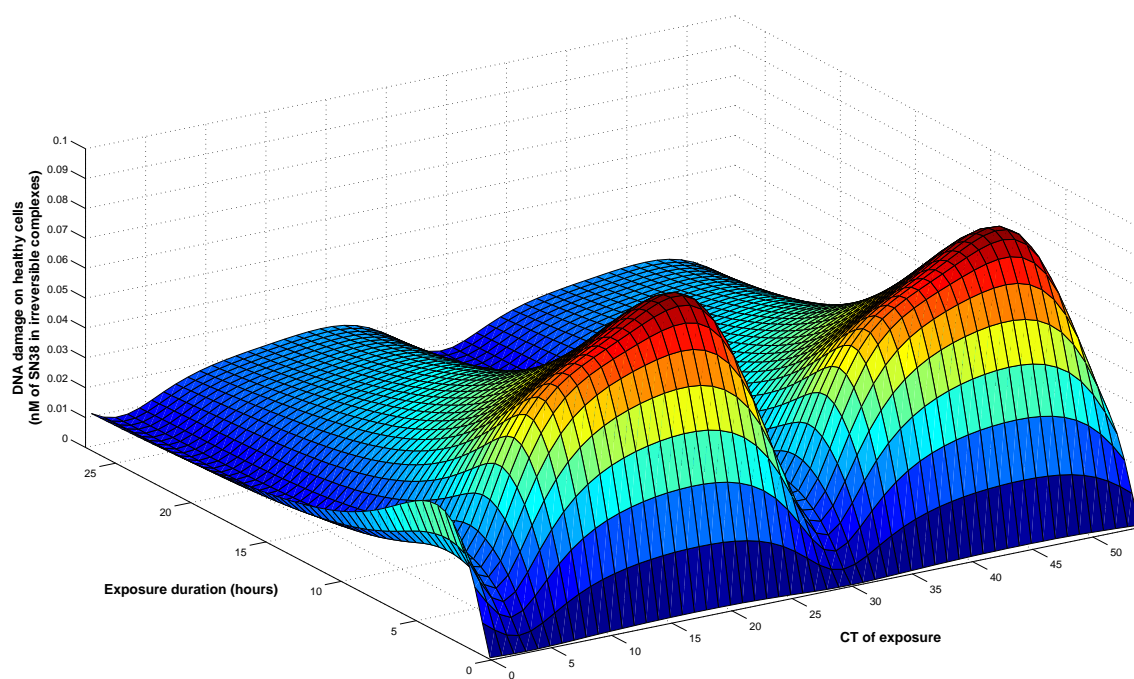


Figure 6

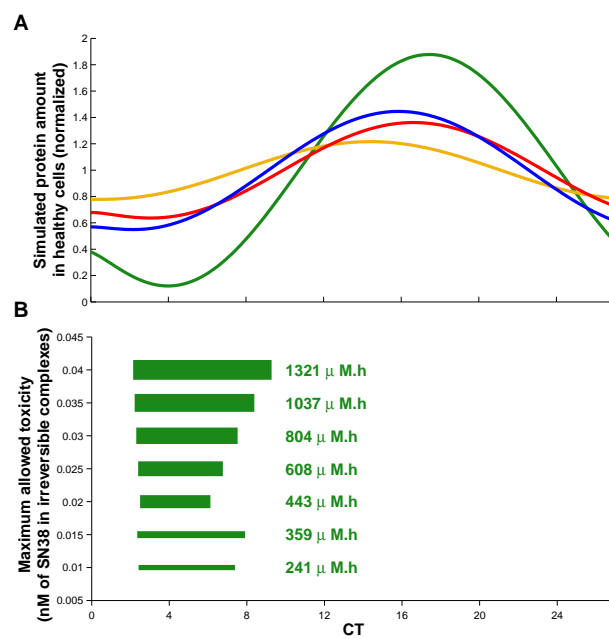


Figure 7

# Supporting Information

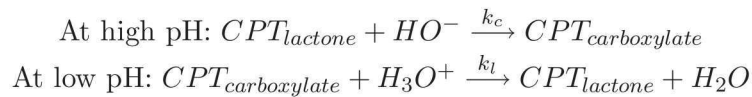
## 1 Materials and Methods

### 1.1 mRNA quantification

Circadian mRNA expressions were quantified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Primers used for amplification of clock genes (*REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, *BMAL1*) and reference (36B4) were described previously ([S1]). The others were ABCB1 sense (CCACAGAGGGGATGGTCAGT), antisense (TAGGCATTGGCTTCCTTGAC), ABCC1 sense (ACCATCCACGACCCTAATCC) and antisense (GACTTGTTCCGACGTGTCCT), ABCC2 sense (ACCTAGGCACATGGCTCCTG) and antisense (CAGGATCTGGAATC-CGTAGG), ABCG2 sense (CCCAGTGTCACAAGGAAACA) and antisense (ACGAA-GATTTGCCTCCACCT), UGT1A1 sense (TCCCAGGAATTTGAAGCCTA) and anti-sense (GTGATAAAGGCACGGGTCAT), TOP1 sense (CCAAGCATAGCAACAGTGAAC) and antisense (GAGGCTCGAACCTTTTCCTC), CES2 sense (GTTAACGCTGCTGAT-GTTGC) and antisense (GGTGGCCTGATGTTCTTGAG). Gene accession numbers were for ABCB1 NM\_000927.3, for ABCC1 NM\_004996.3, for ABCC2 NM\_000392.3, for ABCG2 NM\_004827.2, for UGT1A1 NM\_000463.2, for TOP1 NM\_003286.2 and for CES2 NM\_003869.5. Hybridization temperature for all the primers was 60°C.

### 1.2 The lactone-carboxylate model

A mathematical model was built to study the equilibrium between the lactone and the carboxylate forms of CPT11 with respect to the pH of the solution. The temperature was assumed to be constant and equal to 37°C. We considered that reactions occurred in a closed system containing a buffer solution which kept the pH constant. Two inverse chemical reactions occurred:



The speed of those reactions clearly depends on concentrations of ions  $[H_3O^+]$  and  $[HO^-]$ .

To model this problem we defined two variables:  $CPT_l$  and  $CPT_c$  respectively CPT11 lactone and carboxylate concentrations expressed in  $\mu M$ . As the system was closed, the total quantity of CPT-11 was conserved over time:  $CPT_c + CPT_l = CPT_{tot}$ . Applying the law of mass action and using this conservation law gave the following equation for  $CPT_l$  kinetics:

$$\frac{dCPT_l}{dt} = -(k_l[H_3O^+] + k_c[HO^-])CPT_l + k_l[H_3O^+]CPT_{tot}$$

We then introduced the pH as  $[H_3O^+] = 10^{-pH}$  and  $[HO^-] = 10^{pH-14}$ . This led to:

$$\frac{dCPT_l}{dt} = -(k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14})CPT_l + k_l 10^{-pH} CPT_{tot}$$

As the pH remained constant because of the buffer solution we obtained a simple ODE that was solved analytically:

$$CPT_l(t) = (CPT_l(0) - \frac{B}{A})e^{-At} + \frac{B}{A}$$

with  $A = k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14}$  and  $B = k_l 10^{-pH} CPT_{tot}$

At equilibrium the following holds:

$$CPT_l^* = \frac{B}{A} = \frac{k_l 10^{-pH}}{k_l 10^{-pH} + k_c 10^{pH-14}} CPT_{tot}$$

We used experimental data in Table I and Table II of [32] to estimate  $k_c$  and  $k_l$  by a least square approach using the CMAES algorithm for minimization. Estimated parameter values were:  $k_l = 19300 \text{ h}^{-1}$  and  $k_c = 8.54 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$  (cf. Figure S1, panel 1 and 2). We then validated our model by comparing it to the set of data contained in Figure 6 in [53] (cf. Figure S1, panel 3).

The mother solution of CPT11 is at pH 4.4. In our experimental conditions, cells were cultured in an extracellular medium at pH 7.8. We investigated the needed time to reach the lactone/carboxylate equilibrium after the mother solution was added to the culture medium. Thus we searched for  $t$  such that:  $CPT_l(t) - CPT_l^* \leq eps$  where  $eps$  was a tolerance parameter. At pH=4.4, all CPT-11 molecules were under their lactone form:  $[CPT_l](0) = [CPT_{total}] = 115 \mu M$ . We ended with the analytical formula:

$$t \geq \frac{1}{A} (\ln(CPT_l(0) - \frac{B}{A}) - \ln(eps)).$$

Replacing numerical values in this formula and setting  $eps$  to  $10^{-3}$  gave :  $t \geq 2.9$  . Therefore CPT11 was added to the medium at least 3 hours before using it for cell exposure so that the lactone/carboxylate equilibrium was reached.



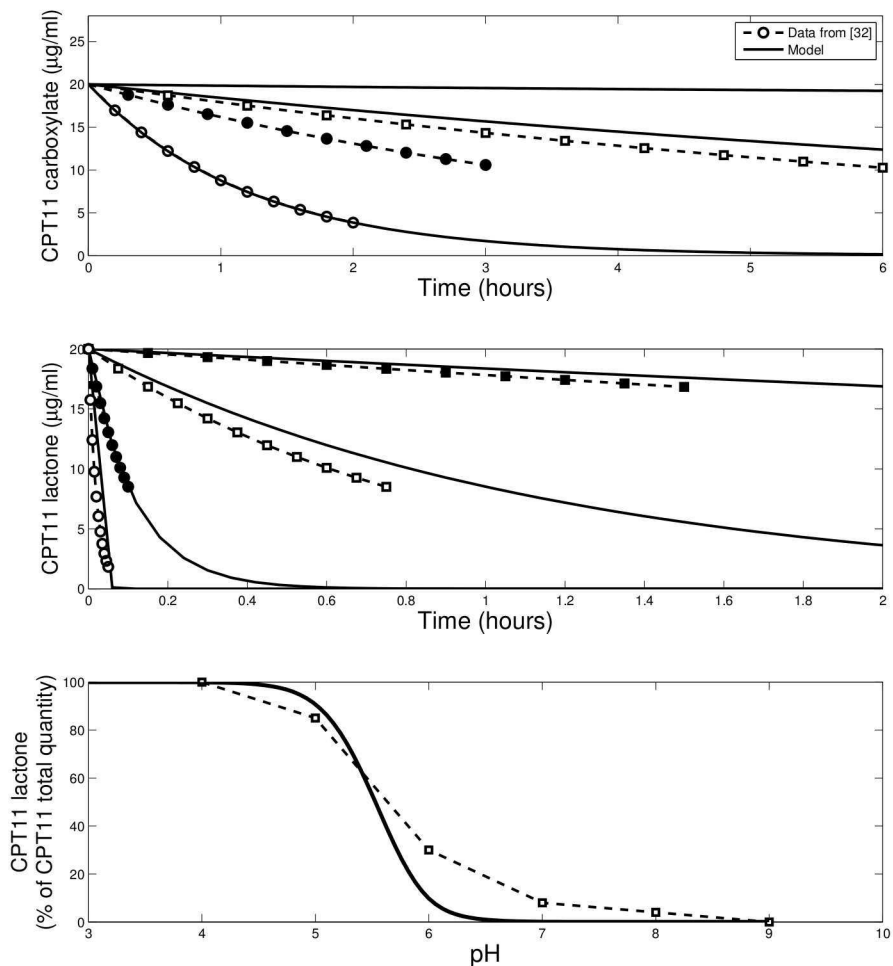


Figure S1: **The lactone/carboxylate model.** Panel 1: CPT11 carboxylate transformation into CPT11 lactone at pH 4 (○), 5 (●) and 6 (□). Panel 2: CPT11 lactone transformation into CPT11 carboxylate at pH 6 (■), 7 (□), 8 (●) and 9 (○). Panel 3: Percentage of CPT11 lactone over CPT11 total quantity at equilibrium with respect to pH. See [53] for details about experimental results

### 1.3 Normalization of HPLC measurements

CPT11 and SN38 extra- and intracellular concentrations were measured by HPLC. The direct results obtained from HPLC depended on the number of cells present in the Petri Dish and were therefore normalized as if all Petri dishes contained one million of cells. Control Petri dishes after 2, 12, 24 and 42 h of exposure were trypsinized and their cell number counted using the Malassez cell. Then we interpolated to obtain the number of cells for the other exposure durations.

HPLC measurements were normalized as follows. Let denote  $n$  the quantity of moles of drug and  $N_c$  the measured number of cells in a Petri dish.  $(\cdot)_{meas}$  stood for the measured value from HPLC,  $(\cdot)_{1M}$  for the normalized value to one million cells. For intracellular concentration, the following holds:  $(n_{in})_{1M} = \frac{(n_{in})_{meas}}{N_c}$ . Therefore we get:

$$(C_{in})_{1M} = \frac{(C_{in})_{meas}}{N_c}.$$

For extracellular concentration normalization, we used the conservation law on the drug total quantity to compute  $(n_{out})_{1M}$ :

$$\begin{aligned} (n_{out})_{1M} &= n_{tot} - \frac{(n_{in})_{meas}}{N_c} \\ (n_{out})_{1M} &= n_{tot} - \frac{1}{N_c}(n_{tot} - (n_{out})_{meas}) \end{aligned}$$

Finally we got:

$$(C_{out})_{1M} = \frac{N_c - 1}{N_c} C_{tot} - \frac{1}{N_c} (C_{out})_{meas}$$

### 1.4 Parameter estimation for circadian gene expressions in synchronized Caco-2 cells

The circadian expression of ten genes were measured in Caco-2 cells, namely three clock genes *REV-ERB $\alpha$* , *PER2*, and *BMAL1*; three metabolism and target genes *TOP1*, *UGT1A1*, *CES2*; and four ABC transporters *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* and *ABCG2*. We assumed that those genes oscillated with the same period  $T$ . Experimental data of mRNA expression were fitted to equation (1) (cf. Materials and Methods). In addition to the common period  $T$ , four parameters have to be estimated for each gene:  $R$ ,  $\lambda$ ,  $P$  and  $S$ . The 41 parameters were estimated simultaneously using a Bootstrap approach. Briefly, data were first normalized so that each mRNA expression had an average value equal to 0 and a standard deviation equal to 1. Then five hundreds datasets were generated by assuming that mRNA values at each time point followed a Gaussian law of average and standard deviation the ones of the corresponding data time point. For each generated dataset, parameters were estimated using a least square approach. The minimization of the cost function was performed using the Matlab function *fmincon* in which interval boundaries were specified for all parameters. Only few constraints of intervals were active: for *PER2*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2* the upper bound on  $\lambda$  was active ( $\lambda < 0.085$ ); for *TOP1* and *ABCB1*, the lower bound on  $R$  was active ( $R > -1.5$ ), for *UGT1A1* the upper bound on  $\lambda$  was active ( $\lambda < 0.07$ ). Finally the mean value and standard deviation of the hundred parameter sets were computed and rescaled to obtain non-normalized values.

## 2 Circadian rhythms of mRNA amounts : variability between experiments

The mRNA amounts of CES2, TOP1, UGT and REV-ERB $\alpha$  were quantified in four independent experiments (Figure S2). CES2 circadian rhythm was consistent in experiment 1, 2 and 4 with an amplitude of 15%, 29%, and 28% of their mean value respectively. On the contrary, no obvious circadian pattern of CES2 expression was noticed in experiment 3. The overshoot in REV-ERB $\alpha$  expression during the first cycle in experiments 1, 2 and 4 was not observed in experiment 3.

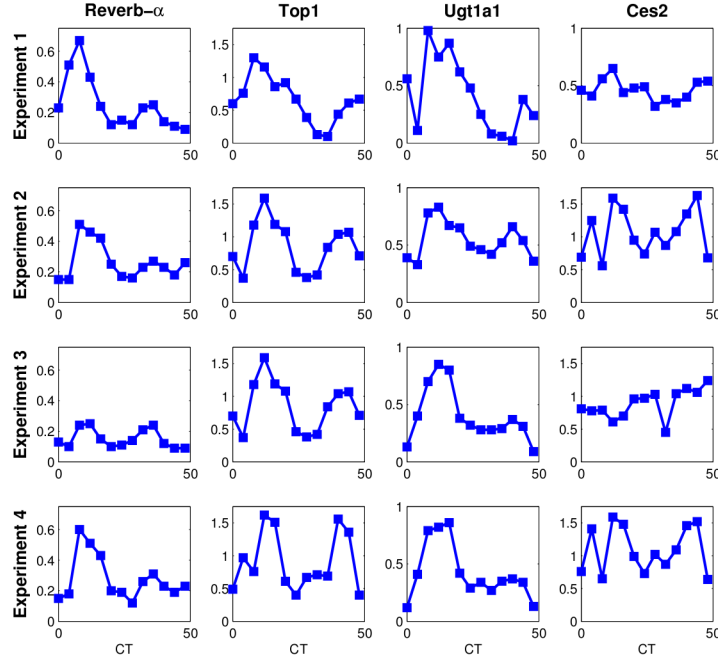


Figure S2: Circadian rhythm of mRNA quantity of REV-ERB $\alpha$ , TOP1, UGT1A1 and CES2 in four independent experiments

### 3 Parameter estimation for the CPT11 molecular PK-PD model

This section aims at giving more details about how the parameters of the CPT11 molecular PK-PD model were estimated. The first step consisted in determining reasonable search intervals for each parameter either based on literature or on unpublished data on our Caco-2 cell line. Then the second step used a bootstrap approach to fit the model to experimental data shown in Figures 2 and 4.

#### 3.1 Determining a search interval for each parameter

Search intervals for parameters were determined as follows:

- CPT11 Uptake: CPT11 uptake was assumed to occur passively at the rate  $k_{upCPT}$ . It was studied in Caco-2 cell culture by measuring CPT11 intracellular concentration after a 10-minute exposure at concentrations from 10 to 100  $\mu\text{M}$  (data not shown). We assumed that in the first ten minutes CPT11 efflux could be neglected as the drug had only time to enter the cell ([20]). This allowed the computation of an approximation of the uptake parameter  $k_{upCPT}=5.9 \text{ h}^{-1}$ . A deviation of  $\pm 50\%$  was allowed in parameter estimation.
- SN38 Uptake: SN38 uptake was assumed to occur passively at the rate  $k_{upSN}$ . As no measurement of SN38 uptake was available in our Caco-2 cells, we used experimental data from [20] to determine SN38 uptake parameter and found:  $k_{upSN}=15.3 \text{ h}^{-1}$ . A deviation of  $\pm 100\%$  was allowed in parameter estimation.
- CPT11 Efflux: CPT11 efflux followed Michaelis-Menten kinetics with parameters  $V_{effCPT}$  and  $K_{effCPT}$ . We used data from Figure 2 and unpublished data on CPT11 accumulation in Caco-2 cells at concentrations 10  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  to compute a guess for the efflux parameters. Indeed once the parameter for CPT11 uptake was approximately known, it was possible to deduce CPT11 efflux parameters from equation (2) by approximating the derivative of  $[CPT11_{out}]$  by a forward Euler scheme. We found:  $V_{effCPT}[ABC\_CPT]=1170 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $K_{effCPT}=71 \mu\text{M}$ . A deviation of  $\pm 50\%$  was allowed in parameter estimation.
- CPT11 bioactivation into SN38 by CESs:  
the transformation of CPT11 into SN38 enhanced by CESs followed Michaelis-Menten kinetics with parameters  $V_{ces}$  and  $K_{ces}$ . As no experimental information was available concerning CPT11 bioactivation kinetics in Caco-2 cells we used data from literature. In [35], they found  $K_{ces}=53 \mu\text{M}$  and  $V_{ces}=0.714 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$  with  $[CES]=2.03 \mu\text{M}$ . In [34], they found  $K_{ces}=53 \mu\text{M}$  and  $V_{ces}=1.018 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$  with  $[CES]=1.42 \mu\text{M}$ . Therefore we searched for  $V_{ces}[CES]$  in the interval  $[0.5, 5]$  and for  $K_{ces}$  in  $[20, 150]$ .
- SN38 efflux: SN38 efflux followed Michaelis-Menten kinetics with parameters  $V_{effSN}$  and  $K_{effSN}$ . Those parameters were directly inferred from experimental data of Figure 2 and 4.
- SN38 deactivation into SN38G by UGT1As: the glucuronidation of SN38 into SN38G catalyzed by enzymes UGT1As followed Michaelis-Menten kinetics with parameters



$V_{ugt}$  and  $K_{ugt}$ . No measurement of SN38G concentration was available in Caco-2 cells. Using the experimental results of [34] the following values were computed:  $V_{ugt}[UGT]=27 \mu\text{M.h}^{-1}$  and  $K_{ugt}=2.13 \mu\text{M}$ . Therefore we searched for  $V_{ugt}[UGT]$  in the interval  $[0, 90]$  and for  $K_{ugt}$  in  $[0, 5]$ .

- Formation and dissociation of DNA/TOP1 reversible complexes: we first determined an approximation of TOP1 total concentration by assuming that all SN38 molecules present in the intracellular medium in Figure 2 were trapped in complexes with TOP1. SN38 intracellular concentration was equal to  $0.01 \mu\text{M}$  in average and data from Figure 3 suggested that around 40% of TOP1 total quantity was trapped in complexes with the drug. Therefore TOP1 total concentration could be estimated to  $0.025 \mu\text{M}$  and was searched within the interval  $[0.01, 0.1]$ . In the absence of drug, around one third of TOP1 was linked to the DNA in caco-2 cells (data not shown) which led to the following initial values for the formation ( $k_{f1}$ ) and dissociation ( $k_{d1}$ ) rates of DNA/TOP1 complexes:  $k_{f1} = 2$ ,  $k_{d1} = 300$ . A deviation of  $\pm 100\%$  was allowed for those two parameters.
- Formation and dissociation of DNA/TOP1/SN38 reversible complexes: the association ( $k_{f2}$ ) and dissociation ( $k_{r2}$ ) rates of SN38 with DNA/TOP1 complexes were directly inferred from experimental data of Figure 2 and 4.
- Formation of irreversible complexes: the irreversible complexes come from collision of reversible complexes with replication or transcription mechanisms which occur at the rate  $k_{Irr}$ . We assumed that this rate was independent of time meaning that the amount and speed of mechanisms going along the DNA was constant. This assumption was realistic in quiescent cells but would be untrue in proliferating cells in which the number of replication forks strongly increases during the S-phase. No prior information was available concerning the parameter  $k_{Irr}$  which was directly fitted to experimental data of Figures 2 and 4.
- DNA total quantity: entry sites where TOP1 can bind to the DNA were assumed to occur every  $k_{entry}$  pairs of bases. Here we defined an entry site as  $k_{entry}$  pairs of bases. When a molecule of TOP1 associated with an entry site, it was consumed and then became a *Compl* molecule. As a cell contains approximately  $3.2 \cdot 10^9$  pairs of base, the number of moles of entry sites was  $\frac{3.2 \cdot 10^9}{N_A k_{entry}}$  where  $N_A$  is the Avogadro number. Thus the concentration of free entry sites in a cell with a volume equal to  $V_{cell} = 8 \cdot 10^{-12} \text{ L}$  is approximately:  $DNA_{tot} = \frac{3.2 \cdot 10^9}{N_A k_{entry} V_{cell}} M$ .  $k_{entry}$  was assumed to be between 1 and 100. Therefore  $DNA_{tot}$  was searched within the interval  $[5, 500]$ .
- Protein amount circadian amplitudes: circadian amplitudes for CES, UGT, ABC\_CPT and ABC\_SN were searched in the interval  $[0, 1]$  so that the protein formation term in equation (12) remained positive.

### 3.2 A bootstrap approach for the second step of parameter estimation

The second step of our parameter estimation consisted in the simultaneous evaluation of the 21 parameters which were searched in the intervals previously determined. The mathematical model was fitted to experimental data on CPT11 and SN38 pharmacokinetics in the presence or absence of verapamil (Figure 2) and CPT11 chrono-pharmacodynamics measured at CT14 and CT28 (Figure 4). Parameters were estimated using a Bootstrap approach. Briefly, fifty datasets were generated from the original one, by assuming that

concentrations at each time point followed a Gaussian law of mean and standard deviation the ones measured at the corresponding data time point. For each generated dataset, parameters were estimated using a least square approach in which the minimization task was performed by the CMAES function. This algorithm was preferred to Matlab function *fmincon* because it handled better local minima. Thus we got 50 parameter sets from which we derived the mean value and standard deviation for each parameter (Table 2).

In order to start the 50 least-square estimations with initial values close to the optimal ones, we firstly determined a preliminary fit. We fitted averaged experimental values of Figures 2 and 4 by a least square approach which was iterated for different initial values of parameters. We thus computed the parameter set which fitted the best the average experimental data and used it as initial values for the bootstrap approach.

## References

- S1. Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, et al. (2005) Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Med* 83(9):693-9.







## Annexe C

# Court-métrage de vulgarisation scientifique : "Soyez Sympa, Synchronisez !"

Les travaux de recherche présentés au chapitre 2 ont fait l'objet d'un court-métrage de vulgarisation scientifique, d'une durée de 7 min, intitulé : "Soyez Sympa, Synchronisez !". L'écriture du scénario, le tournage du film, ainsi que son montage sous le logiciel Final Cut ont été réalisés par moi-même.



Le court-métrage est visionnable aux adresses internet suivantes :

- [http : //interstices.info/jcms/n\\_52317/annabelle – ballesta – a – la – decouverte – des – biomathematiques](http://interstices.info/jcms/n_52317/annabelle-ballesta-a-la-decouverte-des-biomathematiques)
- [http : //annabelle.ballesta.fr](http://annabelle.ballesta.fr)
- [http : //www.dailymotion.com/video/xbvodc \\_soyez–sympa–synchronisez \\_tech](http://www.dailymotion.com/video/xbvodc_soyez-sympa-synchronisez_tech)

Ce film a été réalisé dans le cadre du festival "Les Chercheurs font leur cinéma", organisé par l'association des doctorants de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). Le festival a reçu en novembre 2006 le prix "Le Goût des Siences" du Ministère de la Recherche.







# Bibliographie

- [1] Levi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50 :377-421.
- [2] Smith MR, Burgess HJ, Fogg LF, Eastman CI. Racial differences in the human endogenous circadian period. *PLoS One*. 2009 Jun 30;4(6) :e6014.
- [3] Levi F, Schibler U. Circadian rhythms : mechanism and therapeutics implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47 :593-628.
- [4] Preitner N, Damiola F, Luis Lopez M, Zakany J, Duboule D, et al. The orphan nuclear receptorREV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002;110 :251
- [5] Carr AJ, Whitmore D. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol*. 2005;7(3) :319-21.
- [6] Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*. 2004;14(24) :2289-95.
- [7] Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998;93(6) :929-37.
- [8] Izumo M, Sato TR, Straume M, Johnson CH. Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput Biol*. 2006;2(10) :e136.
- [9] Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*. 2002;12(18) :1574-83.
- [10] Levi F, Boughattas N, Blazsek I. Comparative murine chronotoxicity of anticancer agents and related mechanisms. *Annu. Rev. Chronopharmacol*. 1988; 4 :283-331 47.
- [11] Sothorn R, Halberg F, Hrushesky W. Circadian stage not time of day characterizes doxorubicin susceptibility rhythm of mice in continuous light. *Annu. Rev. Chronopharmacol*. 1988; 5 :385 88
- [12] Granda TG, Levi F. Tumor-based rhythms of anticancer efficacy in experimental models. *Chronobiol. Int*. 2002; 19 :21 41
- [13] Giacchetti S, Bjarnason G, Garufi C, Genet D, Iacobelli S, et al. (2006) Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer : the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol* 24(22) :3562-9.

- [14] Brown SA, Kunz D, Dumas A, Westermarck PO, Vanselow K, et al. (2008) Molecular insights into human daily behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 :1602-7.
- [15] Pasqua G, Monacelli B, Valletta A. Cellular localisation of the anti-cancer drug camptothecin in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae). *Eur J Histochem.* 2004 Jul-Sep ;48(3) :321-7.
- [16] Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors : camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6(10) :789-802.
- [17] Heck M et al., Differential expression of DNA topoisomerase I and II during eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 85, pp.1086-1090, 1988.
- [18] Rallabhandi P et al., Sumoylation of Topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to Camptothecin. *J. of Biological Chemistry*, Vol.277, pp. 40020-40026, 2002.
- [19] Horie K et al., SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation by camptothecin. *Oncogene*, Vol.21, pp. 7913-7922, 2002.
- [20] Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT11). *Clin Cancer Res.* 2001 ;7(8) :2182-94.
- [21] Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM, Conversion of Irinotecan(CPT-11) to its Active Metabolite,7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin(SN-38), by Human Liver Carboxylesterase, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 52, pp. 1103-1111, 1996.
- [22] Yang XX, Hu ZP, Xu AL, Duan W, Zhu YZ, et al. (2006) A mechanistic study on reduced toxicity of irinotecan by coadministered thalidomide, a tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 319(1) :82-104.
- [23] Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y, Sawada J (2001) Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica* 31(10) :687-99.
- [24] Tallman MN, Ritter JK, Smith PC (2005) Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab Dispos* 33(7) :977-83.
- [25] Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, et al. (2006) The in vitro metabolism of irinotecan (CPT11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. *Br J Clin Pharmacol* 62(1) :122-9.
- [26] Akimoto K, Kawai A, Ohya K (1994) Kinetic studies of the hydrolysis and lactonization of camptothecin and its derivatives, CPT11 and SN38, in aqueous solution. *Chem Pharm Bull* 42(10) :2135-2138.
- [27] Ikegami T, Ha L, Arimori K, Latham P, Kobayashi K, Ceryak S, et al. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhoea. *Cancer Res* 2002 ;62(1) :179-87.
- [28] Takeda Y, Kobayashi K, Akiyama Y, Soma T, Handa S, Kudoh S, et al. Prevention of irinotecan (CPT-11)-induced diarrhoea by oral alkalization combined with control of defecation in cancer patients. *Int J Cancer* 2001 ;92(2) :269-75.

- [29] Kobayashi K, Bouscarel B, Matsuzaki Y, Ceryak S, Kudoh S, et al. (1999) pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN38, by intestinal cells. *Int J Cancer* 83(4) :491-6.
- [30] Itoh T, Itagaki S, Sumi Y, Hirano T, Takemoto I, et al. (2005) Uptake of irinotecan metabolite SN38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother Pharmacol* 55(5) :420-4.
- [31] Smith NF, Figg WD, Sparreboom A (2006) Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport : an update. *Toxicol In Vitro* 20(2) :163-75.
- [32] Lalloo AK, Luo FR, Guo A, Paranjpe PV, Lee SH, et al. (2004) Membrane transport of camptothecin : facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC Med* 2 :16.
- [33] Panda S, Antoch M, Miller B, Su A, Schook A. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109 :307-20, 2002.
- [34] Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F. Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol. Cell Biol.* 19 :6488-99, 1999
- [35] Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U (2006). The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 4 : 25-36.
- [36] Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417 :78-83, 2002.
- [37] Kornmann B, Preitner N, Rifat D, Fleury-Olela F, Schibler U. Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 29 :E51-1, 2001.
- [38] Guo Y, Lu P, Farrell E, Zhang X, Weller P. In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 :17735-40, 2007.
- [39] Kanno Y, Otsuka S, Hiromasa T, Nakahama T, Inouye Y. Diurnal difference in CAR mRNA expression. *Nucl Recept.* 2004 Aug 28 ;2(1) :6.
- [40] Zhang Y, Yeager R, Klaassen C. Circadian expression profiles of drug processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* 37 :106-15 70, 2009
- [41] Ando H, Yanagihara H, Sugimoto K, Hayashi Y, Tsuruoka S, et al. (2005) Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiol Int* 22(4) :655-65.
- [42] Kuramoto Y, Hata K, Koyanagi S, Ohdo S, Shimeno H, et al. (2006) Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 71(8) :1155-61.
- [43] Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, et al. (1997) Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3) :1383-8.
- [44] Yang F, Nakajima Y, Kumagai M, Ohmiya Y, and Ikeda M. The molecular mechanism regulating the autonomous circadian expression of Topoisomerase I in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 380 :22-7, 2009.
- [45] Filipski E, Lemaigre G, Liu XH, Mery-Mignard D, Mahjoubi M, Levi F. Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiol Int.* 2004 Jul ;21(4-5) :613-30.

- [46] Granda TG, D’Attino RM, Filipinski E, Vrignaud P, Garufi C, et al. (2002) Circadian optimisation of irinotecan and oxaliplatin efficacy in mice with Glasgow osteosarcoma. *Br J Cancer* 86(6) :999-1005.
- [47] Bernard S, Cajavec Bernard B, Lévi F, Herzel H. Tumour growth rate determines the timing of optimal chronomodulated treatment schedules. *PLoS Comput Biol.* 3 :1000712, 2010.
- [48] Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G, Adam R, Zidani R, Kunstlinger F, Brienza S, Alafaci E, Bertheault-Cvitkovic F, Jasmin C, Reynes M, Bismuth H, Misset J, Lévi F. Longterm survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol.* 6 :663-9, 1999.
- [49] Levi F, Giacchetti S, Zidani R, Brezault-Bonnet C, Tigaud J, Goldwasser F, Misset J. Chronotherapy of colorectal cancer metastases. *Hepatogastroenterology.* 38 :320-2, 2001
- [50] Gholam D, Giacchetti S, Brezault-Bonnet C, Bouchahda M, Hauteville D, et al. (2006) Chronomodulated irinotecan, oxaliplatin, and leucovorin-modulated 5-Fluorouracil as ambulatory salvage therapy in patients with irinotecan- and oxaliplatin-resistant metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 11(10) :1072-80.
- [51] Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol.* 1;25(13) :1670-6, 2007.
- [52] Garufi C, Vanni B, Aschelter AM, Zappala AR, Bria E, et al. (2006) Randomised phase II study of standard versus chronomodulated CPT11 plus chronomodulated 5-fluorouracil and folinic acid in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 42(5) :608-16.
- [53] Desai SD, Li TK, Rodriguez-Bauman A, Rubin EH, Liu LF. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res.* 2001 Aug 1 ;61(15) :5926-32.
- [54] Catley L, Tai YT, Shringarpure R, Burger R, Son MT, Podar K, Tassone P, Chauhan D, Hideshima T, Denis L, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC. Proteasomal degradation of topoisomerase I is preceded by c-Jun NH2-terminal kinase activation, Fas up-regulation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in SN38-mediated cytotoxicity against multiple myeloma. *Cancer Res.* 2004 Dec 1 ;64(23) :8746-53.
- [55] Eder JP, Rubin E, Stone R, Bryant M, Xi G-X, Supko J, et al. Trials of 9-amino-20(S)-camptothecin in Boston. *Ann. NY Acad. Sci.*, 803 : 247-255, 1996.
- [56] Rubin E, Wood V, Bharati A, Trites D, Lynch C, Hurwitz S, Bartel S, et al. A phase I and pharmacokinetic study of a new camptothecin derivative, 9-amino-camptothecin. *Clin. Cancer Res.*, 1 :269-276, 1995.
- [57] Nestorov I. Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Apr ;3(2) :235-49.



- [58] De Buck SS, Mackie CE. Physiologically based approaches towards the prediction of pharmacokinetics : in vitro-in vivo extrapolation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Dec ;3(6) :865-78.
- [59] Poirier A, Funk C, Scherrmann JM, Lavé T. Mechanistic modeling of hepatic transport from cells to whole body : application to napsagatran and fexofenadine. *Mol Pharm.* 2009 Nov-Dec ;6(6) :1716-33.
- [60] Pardini L, Kaeffer B, Trubuil A, Bourreille A, Galmiche JP (2005) Human intestinal circadian clock : expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol Int* 22(6) :951-61.
- [61] Goldwasser F, Bae I, Valenti M, Torres K, Pommier Y (1995) Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res* 55(10) :2116-21.
- [62] Subramanian D, Kraut E, Staubus A, Young DC, Muller MT (1995) Analysis of topoisomerase I/DNA complexes in patients administered topotecan. *Cancer Res* 55(10) :2097-103.
- [63] Hsiang YH et al., DNA Topoisomerase I-mediated DNA Cleavage and Cytotoxicity of Camptothecin Analogues, *Cancer Research* Vol. 49, pp.4385-4389, 1989
- [64] S. Faivre S et al., DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells, *Biochemical Pharmacology* 66, pp.225-237, 2003
- [65] Tabas LB et al., A high- throughput assay for measurement of multidrug resistance protein-mediated transport of leukotriene C4 into membrane vesicles, *Analytical Biochemistry* , Vol.310 , pp. 61-66, 2002.
- [66] Woebking B et al., Drug-Lipid A Interactions on the Escherichia coli ABC transporter MsbA, *Journal of Bacteriology* , Vol.187, No. 18, pp. 6363-6369, 2005.
- [67] Gagne JF et al., Common Human UGT1A Polymorphisms and the Altered Metabolism of Irinotecan Active Metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin(SN-38),*Molecular Pharmacology*,Vol. 62, No. 3,pp. 608-617, 2002
- [68] Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, et al. (2008) Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci* 35(5) :383-96.
- [69] Vladu B, Woynarowski JM, Manikumar G, Wani MC, Wall ME, Von Hoff DD, Wadkins RM, 7- and 10-substituted Camptothecins : Dependence of Topoisomerase I-DNA Cleavable Complex Formation and Stability on the 7- and 10-Substituents,*Molecular Pharmacology*, Vol.57, pp.243-251, 2000.
- [70] May K, Minarikova V, Linnemann K, Zygmunt M, Kroemer HK, et al. (2008) Role of the multidrug transporter proteins ABCB1 and ABCC2 in the diapla-cental transport of talinolol in the term human placenta.*Drug Metab Dispos* 36(4) :740-4.
- [71] Levi F, Altinok A, Clairambault J, Goldbeter A (2008) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 366(1880) :3575-98.

- [72] Basdevant C, Clairambault J, Levi F (2005) Optimisation of time-scheduled regimen for anti-cancer drug infusion. *ESAIM :M2AN* 39(6) :1069-1086.
- [73] Henrich CJ, Bokesch HR, Dean M, Bates SE, Robey RW, et al. (2006) A high-throughput cell-based assay for inhibitors of ABCG2 activity. *J Biomol Screen* 11(2) :176-83.
- [74] Lemma GL, Wang Z, Hamman MA, Zaheer NA, Gorski JC, et al. (2006) The effect of short- and long-term administration of verapamil on the disposition of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein substrates. *Clin Pharmacol Ther* 79(3) :218-30.
- [75] Ahowesso C, Li XM, Guettier C, Bareggi S, Filipinski E, et al. 2009. Preclinical model for the personalization of cancer chronotherapeutics. Presented at Congr. Eur. Biol. Rhythm Soc., 11th, Strasbourg, France
- [76] Porsin B, Formento JL, Filipinski E, Etienne MC, Francoual M, et al. (2003) Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver : comparison between enzyme activity and gene expression. *Eur J Cancer* 39(6) :822-8.
- [77] Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, Sordet O, Jobson AG, et al. (2006) Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81 :179-229.
- [78] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, Reardon JT, Lee JH, et al. (2010) Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett* 584(12) :2618-25.
- [79] Bjarnason GA, Jordan R (2002) Rhythms in human gastrointestinal mucosa and skin. *Chronobiol Int* 19(1) :129-40.
- [80] Granda TG, Liu XH, Smaaland R, Cermakian N, Filipinski E, et al. (2005) Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *FASEB J* 19(2) :304-6.
- [81] De Maria E, Fages F, Soliman S (2009) On Coupling Models Using Model-Checking : Effects of Irinotecan Injections on the Mammalian Cell Cycle. *Lecture Notes in Computer Science* 5688 :142-157.
- [82] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer : role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan ;2(1) :48-58.
- [83] Takeba Y, Sekine S, Kumai T, Matsumoto N, Nakaya S, Tsuzuki Y, et al. Irinotecan-induced apoptosis is inhibited by increased P-glycoprotein expression and decreased p53 in human hepatocellular carcinoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2007 Aug ;30(8) :1400-6.
- [84] Bessho Y, Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, Maeda H, Niimi T, Sato S, Ueda R. Role of ABCG2 as a biomarker for predicting resistance to CPT-11/SN-38 in lung cancer. *Cancer Sci*. 2006 Mar ;97(3) :192-8.
- [85] Candeil L et al., ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in Irinotecan-treated metastases, *Int. J. Cancer* vol. 109, pp.848-854, 2004
- [86] Habraken Y, Piette J. NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30 ;72(9) :1132-41. Epub 2006 Sep 11.
- [87] Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, Shumway SD, Kurama T, Boothman DA, Miyamoto S. NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31 ;275(13) :9501-9.

- [88] Bottero V, Busuttil V, Loubat A, Magna N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin : a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001 Nov 1 ;61(21) :7785-91.
- [89] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene.* 2003 Jan 9 ;22(1) :90-7.
- [90] Kameyama N, Arisawa S, Ueyama J, Kagota S, Shinozuka K, Hattori A, et al. Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase Calpha and NF-kappaB p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May ;1782(5) :355-60. Epub 2008 Mar 4.
- [91] Adachi T, Nakagawa H, Chung I, Hagiya Y, Hoshijima K, Noguchi N, Kuo MT, Ishikawa T. Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J Exp Ther Oncol.* 2007 ;6(4) :335-48.
- [92] Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24 ;310(3) :824-9.
- [93] Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jul ;33(7) :956-62. Epub 2005 Apr 15.
- [94] Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The keap1-nrf2 cellular defense pathway : mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb Exp Pharmacol.* 2010 ;(196) :233-66.
- [95] Sebens S, Arlt A, Schafer H. NF-kappaB as a molecular target in the therapy of pancreatic carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2008 ;177 :151-64.
- [96] Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 2000 May 1 ;60(9) :2323-30.
- [97] Guo J, Verma UN, Gaynor RB, Frenkel EP, Becerra CR. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Clin Cancer Res.* 2004 May 15 ;10(10) :3333-41.
- [98] Luu KT, Uchizono JA. P-glycoprotein induction and tumor cell-kill dynamics in response to differential doxorubicin dosing strategies : a theoretical pharmacodynamic model. *Pharm Res.* 2005 May ;22(5) :710-5. Epub 2005 May 17.
- [99] Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, Delaunay F, Levi F, Milano G., Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells, *J Mol Med.* 2005 Sep ;83(9) :693-9. Epub 2005 Aug 12.
- [100] Ahowesso C, Li XM, Scaglione F, Guettier C, Zampera S, Okyar A, Dulong S, Filipski E, Bareggi S, Levi F. Identification of irinotecan chronotoxicity classes and their implications for antitumor efficacy in mice. submitted

- [101] Ahowesso C, Approche expérimentale de la personnalisation de la chronothérapie par irinotecan, Thèse Université Paris 11, 2011.
- [102] M.B. Reddy, R.H. Yang, H.J. Clewell, M.E. Andersen, Physiologically based pharmacokinetic modelling science and applications, édition Wiley, 2005.
- [103] Tsukamoto Y, Kato Y, Ura M, Horii I, Ishitsuka H, Kusuhara H, Sugiyama Y. A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans : the mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm Res.* 2001 Aug ;18(8) :1190-202.
- [104] Slatter JG, Schaaf LJ, Sams JP, Feenstra KL, Johnson MG, Bombardt PA. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients. *Drug Metab Dispos.* 28(4) :423-33, 2000.
- [105] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 10(7) :1093-1095, Jul 1993.
- [106] Brand W, Schutte ME, Williamson G, van Zanden JJ, Cnubben NH, Groten JP, van Bladeren PJ, Rietjens IM. Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, foodborne toxic compounds and bioactive ingredients. *Biomed Pharmacother.* 2006 Nov ;60(9) :508-19. Epub 2006 Sep 1.
- [107] Bruce Stanton Chair, Summary of the Speaker Presentations : ABC transporters in liver, kidney, and intestine, *Kidney International*, Hanover, New Hampshire, USA 62, 1520-1521, 2002.
- [108] Chabot GG, Robert J, Lokiec F, Canal P. Irinotecan pharmacokinetics. *Bull Cancer*, Spec No :11-20, Dec 1998.
- [109] Combes O, Barré J, Duché JC, Vernillet L, Archimbaud Y, Marietta MP et al. In vitro binding and partitioning of irinotecan (cpt-11) and its metabolite, sn-38, in human blood. *Invest New Drugs*, 18(1) :1-5, 2000.
- [110] Morgan D., *The Cell Cycle, Principles of Control*, Primers in Biology, New Science Press Ltd and Oxford University Press, 2007.
- [111] Cartwright CA, Meisler AI, Eckhart W (1990) Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2) :558-62.
- [112] Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE (1993) Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* 91(1) :53-60.
- [113] Nautiyal J, Majumder P, Patel BB, Lee FY, Majumdar AP (2009) Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer Lett* 283(2) :143-51.
- [114] Lopez J, Aouacheria A, Gillet G, Gonzalo P. Src controls cell death sensitivity through Nbk/Bik ubiquitylation in mouse fibroblasts and human cancer cells, submitted
- [115] Ingley E (2008) Src family kinases : regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784(1) :56-65.
- [116] Johnson FM, Gallick GE (2007) SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 7(6) :651-9.

- [117] Araujo J, Logothetis C (2010) Dasatinib : a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev* 36(6) :492-500.
- [118] Kopetz S, Shah AN, Gallick GE (2007) Src continues aging : current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 13(24) :7232-6.
- [119] Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Lebwohl DE, Vinitsky A, Rosen N (1995) Herbi-mycin A induces the 20 S proteasome- and ubiquitin-dependent degradation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 270(28) :16580-7.
- [120] Thomadaki H, Scorilas A (2006) BCL2 family of apoptosis-related genes : functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43(1) :1-67.
- [121] Brenner D, Mak TW (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21(6) :871-7.
- [122] Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, et al. (1998) BAX directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9) :4997-5002.
- [123] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 2006 Dec;8(12) :1348-58. Epub 2006 Nov 19.
- [124] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family : opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1) :47-59.
- [125] George NM, Targy N, Evans JJ, Zhang L, Luo X (2010) BAX contains two functional mitochondrial targeting sequences and translocates to mitochondria in a conformational change- and homo-oligomerization-driven process. *J Biol Chem* 285(2) :1384-92.
- [126] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, et al. (1997) Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5) :1281-92.
- [127] Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S et al. (2007) BAX activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12(5) :887-96.
- [128] Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2(3) :156-62.
- [129] Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH (2000) Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of BAX through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 149(2) :431-46.
- [130] Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, et al. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to anti-apoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9(5) :351-65.
- [131] Fesik SW (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5(11) :876-85.
- [132] Kang MH, Reynolds CP (2009) BCL2 inhibitors : targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15(4) :1126-32.
- [133] Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, et al. (1990) Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell

- growth and survival : comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 50(20) :6565-70.
- [134] Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA (2000) Bcl-xL in prostate cancer cells : effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res* 60(21) :6052-60.
  - [135] Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, et al. (2000) A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax. *Gene Ther* 7(1) :75-9.
  - [136] Pataer A, Fang B, Yu R, Kagawa S, Hunt KK, et al. (2000) Adenoviral Bak overexpression mediates caspase-dependent tumor killing. *Cancer Res* 60(4) :788-92.
  - [137] Tsuruta Y, Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Kusakari T, et al. (2001) Combination effect of adenovirus-mediated pro-apoptotic bax gene transfer with cisplatin or paclitaxel treatment in ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 37(4) :531-41.
  - [138] Lo HW, Day CP, Hung MC. Cancer-specific gene therapy. *Adv Genet.* 2005;54 :235-55.
  - [139] Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, et al. (2010) Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene* 29(46) :6085-98.
  - [140] Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of BAX and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8) :3668-72.
  - [141] Perez D, White E (2000) TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in BAX that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell* 6(1) :53-63.
  - [142] Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, et al. (2004) The first alpha helix of BAX plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins BID and PUMA. *Mol Cell* 16(5) :807-18.
  - [143] Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, et al. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302(5647) :1036-8.
  - [144] Nicolier M, Decrion-Barthod AZ, Launay S, Pr  tet JL, Mougin C (2009) Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53wt and p53mt human cervical carcinoma cells. *Biol Cell* 101(8) :455-67.
  - [145] Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R (2008) BIK, the founding member of the BH3-only family proteins : mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27 Suppl 1 :S20-9.
  - [146] Dewson G, Kluck RM, Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis, *Journal of Cell Science* 122, 2801-2808, 2009.
  - [147] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK et al. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6) :1799-805.
  - [148] Reed JC (2006) Proapoptotic multidomain BCL2/BAX-family proteins : mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 13(8) :1378-86.

- [149] Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC (2010) Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J* 29(3) :606-18.
- [150] Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24(8) :1546-56.
- [151] Calzone L, Tournier L, Fourquet S, Thieffry D, Zhivotovsky B, et al. (2010) Mathematical modelling of cell-fate decision in response to death receptor engagement. *PLoS Comput Biol* 6(3) :e1000702.
- [152] Schlatter R, Schmich K, Avalos Vizcarra I, Scheurich P, Sauter T, et al. (2009) ON/OFF and beyond—a boolean model of apoptosis. *PLoS Comput Biol* 5(12) :e1000595.
- [153] Legewie S, Bluthgen N, Herzel H (2006) Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. *PLoS Comput Biol* 2(9) :e120.
- [154] Bagci EZ, Vodovotz Y, Billiar TR, Ermentrout GB, Bahar I (2006) Bistability in apoptosis : roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. *Biophys J* 90(5) :1546-59.
- [155] Grills C, Crawford N, Chacko A, Johnston PG, O'Rourke F, et al. (2008) Dynamical systems analysis of mitochondrial BAK activation kinetics predicts resistance to BH3 domains. *PLoS One* 3(8) :e3038.
- [156] Chen C, Cui J, Lu H, Wang R, Zhang S, et al. (2007) Modeling of the role of a BAX-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision. *Biophys J* 92(12) :4304-15.
- [157] Cui J, Chen C, Lu H, Sun T, Shen P (2008) Two independent positive feedbacks and bistability in the BCL2 apoptotic switch. *PLoS One* 3(1) :e1469.
- [158] J Keener, J Sneyd, *Mathematical Physiology*, Inter. Appl. Math., Math. Bio.
- [159] Segel L.A., Slemrod M. *The Quasi-Steady-State Assumption : A Case Study in Perturbation*. SIAM Review, Vol. 31, No. 3. (Sep., 1989), pp. 446-477.
- [160] Bassingthwaite JB, Goresky CA. Ch.13 : Modeling in the analysis of solute and water exchange in the microvasculature. *HandBook of Physiology*. 1984 ;560.
- [161] Nelson W, Tong Y, Lee J, Halberg F. *Methods for cosinor-rhythmometry*. *Chronobiologia*. 4 :305-23, 1979.
- [162] Duhamel P, Vetterli M, *Fast Fourier transforms : a tutorial review and a state of the art*, *Signal Processing* 19, 259-299, 1990.
- [163] Zoubi A. M., *The Bootstrap : A Powerful Tool for Statistical Signal Processing with Small Sample Sets*, ICASSP 99 Bootstrap Tutorial Slides and Matlab Demo, 1999. <http://www.nt.tu-darmstadt.de/nt/index.php?id=227>
- [164] Broyden C G, *The Convergence of a Class of Double-rank Minimization Algorithms*, *Journal of the Institute of Mathematics and Its Applications* 1970, 6, 76-90.
- [165] Shanno D F, *Conditioning of Quasi-Newton Methods for Function Minimization*, *Mathematics of Computation* 1970, 24, 647-656

- [166] Hansen, N (2006) The CMA evolution strategy : a comparing review. Towards a new evolutionary computation. Advances on estimation of distribution algorithms. Springer 75-102.
- [167] Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction : twenty-something years on. Nat Protoc 1(2) :581-5.
- [168] Cohen B., Mise au point d'un modèle *in vitro* de chronopharmacologie cellulaire. Rapport de stage, Université Paris XI, 2009.







# Table des figures

1.1	<b>Représentation schématique du système circadien</b> Le système circadien est composé de a) un pacemaker central, les noyaux suprachiasmatiques (NSC) situés dans l'hypothalamus, b) des signaux circadiens générés par les NSC et c) des horloges circadiennes des cellules dans les tissus périphériques. Les NSC exercent un contrôle sur les horloges périphériques à travers des signaux hormonaux, le système nerveux sympathique et para-sympathique, ou des cycles de température. Les horloges moléculaires contrôlent rythmiquement le métabolisme des médicaments ainsi que le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et l'angiogénèse. Figure adaptée de [1]	30
1.2	<b>Modèle simplifié de l'oscillateur circadien chez les mammifères</b> L'oscillateur moléculaire est composé d'une partie positive (BMAL1, CLOCK, NPAS2) et d'une partie négative (CRY, PER) qui sont interconnectées via le récepteur nucléaire orphelin REV-ERB $\alpha$ . Figure adaptée de [3].	31
1.3	<b>Dispositifs pour études de chronobiologie chez la souris</b>	33
1.4	<b>Influence du temps circadien sur la toxicité des médicaments anticancéreux.</b> Le diagramme montre la chronotolérance à 16 agents anticancéreux, étudiée chez des souris mâles B6D2F1, synchronisées en LD12 :12. Les pictogrammes sont placés sur le cercle à l'heure de meilleure tolérabilité (de 0 à 24 heures après le début de la lumière (HALO)); à une distance du centre du cercle correspondant au bénéfice de survie entre l'heure optimale et la pire heure d'administration (compris entre 0 et 200%). Le rythme circadien moyen de la température corporelle est tracé dans le cercle interne, et est utilisé comme biomarqueur endogène du système circadien. Figure adaptée de [1]	34
1.5	<b>La pompe Mélodie<sup>TM</sup></b>	37
1.6	<b>Schéma d'Administration Chronomodulée ChronoFLO5</b> Le schéma consiste en l'administration durant 5 jours consécutifs d'oxaliplatine, de 5-FU et de leucovorine, chaque médicament étant infusé suivant une courbe en cloche d'une durée de 11.5 h, qui atteint son maximum à 16 h pour l'oxaliplatine et 4 h du matin pour le 5-FU et la leucovorine.	38
1.7	<b>Arbre <i>Camptotheca acuminata decne.</i></b> Le principe actif de l'irinotecan est extrait de cet arbre chinois.	41

1.8	<b>Représentation schématique de la PK-PD moléculaire de l'irinotecan</b> L'irinotecan entre passivement dans les cellules et est bioactivé en SN38 par les CESs. Il est également métabolisé en APC et NPC, seul NPC pouvant être transformé en SN38. Le SN38 est ensuite désactivé en SN38G par les enzymes UGT1As. L'irinotecan et ses métabolites sont transportés activement vers le milieu extracellulaire par ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2. . . . .	43
2.1	<b>Voies moléculaires considérées de la PK-PD de l'irinotecan dans les cellules Caco-2.</b> Le CPT11 dans le milieu extracellulaire ( $CPT_{out}$ ) diffuse passivement à travers la membrane cellulaire et pénètre dans le compartiment intracellulaire ( $CPT_{in}$ ). Il est ensuite activé en SN38 ( $SN_{in}$ ) par les CESs. Le SN38 est désactivé en SN38G ( $SNG_{in}$ ) sous l'action d'enzymes UGT1As. $CPT_{in}$ , $SN_{in}$ et $SNG_{in}$ sont expulsés vers l'extérieur des cellules par des transporteurs ABC ( $CPT_{out}$ , $SN_{out}$ , $SNG_{out}$ ). La $TOP1$ est une enzyme dont la fonction est de diminuer la tension présente dans les molécules d'ADN. Pour se faire, elle crée des complexes transitoires $DNA/TOP1$ , que $SN_{in}$ stabilise en complexes ternaires $DNA/TOP1/SN38$ , qui sont encore spontanément réversibles. Leur collision avec des mécanismes parcourant l'ADN provoque des lésions irréversibles à l'ADN qui déclenche les processus de réparation de l'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire le cas échéant, et mène possiblement la cellule à l'apoptose. . . . .	52
2.2	<b>Évolution temporelle des concentrations extra et intracellulaires du CPT11, SN38 et SN38G durant l'exposition au CPT11.</b> Les concentrations en absence ( $\circ$ ) ou présence ( $\blacksquare$ ) de verapamil sont les moyennes de quatre points de données, provenant de deux expériences indépendantes ( $\pm$ SEM). Les lignes continues et pointillées correspondent aux simulations du modèle mathématique, calibré aux données, en absence ou présence de verapamil respectivement. <b>A, B, C</b> : concentrations extracellulaires de CPT11, SN38 et SN38G ; <b>D, E, F</b> : concentrations intracellulaires de CPT11, SN38 et SN38G (pour le SN38, somme des molécules libres et liées à l'ADN). . . . .	58
2.3	<b>Concentrations extra et intracellulaires de CPT11 après 10 min d'exposition, dans des cellules Caco-2 non synchronisées.</b> Les points oranges sont la moyenne $\pm$ SEM de deux points de données provenant de la même expérience. La courbe bleue est le modèle d'approximation de l'absorption du CPT11 présenté à la section 2.4. . . . .	59
2.4	<b>Concentrations extra et intracellulaires de CPT11 après 48 h d'exposition, dans des cellules Caco-2 non synchronisées.</b> Moyenne $\pm$ SEM de deux points de données provenant d'une même expérience. . . . .	60

2.5	<b>Rythme circadien des expressions de gènes de l'horloge et de la pharmacologie de l'irinotecan dans des cellules Caco-2 synchronisées.</b> La quantité d'ARN messagers de 3 gènes de l'horloge ( <i>REV-ERB<math>\alpha</math></i> , <i>PER2</i> , <i>BMAL1</i> ) et 7 gènes de la PK-PD de l'irinotecan ( <i>TOP1</i> , <i>UGT1A1</i> , <i>CES2</i> , <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> , <i>ABCC2</i> , <i>ABCG2</i> ) présentent des variations circadiennes d'une période de 26 h 50 (SD 63 min). Les résultats expérimentaux sont la moyenne ( $\pm$ SEM) de quatre expériences indépendantes pour <i>REV-ERB<math>\alpha</math></i> , <i>TOP1</i> , <i>UGT1A1</i> , et <i>CES2</i> , et de 3 expériences indépendantes pour <i>PER2</i> , <i>BMAL1</i> , <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> , <i>ABCC2</i> , et <i>ABCG2</i> . Les courbes continues correspondent à l'équation 2.15 ajustées aux données (cf. Tableau 2.1 pour les valeurs de paramètres). . . . .	62
2.6	<b>Rythme circadien des quantités d'ARN de REV-ERB<math>\alpha</math>, TOP1, UGT1A1 et CES2 dans quatre expériences indépendantes.</b>	64
2.7	<b>Expression génique, protéique, et activité de la TOP1. A</b> ARN messagers : données expérimentales et modèle présentés à la figure 2.5 <b>B</b> Protéines nucléaires et cytoplasmiques. Les résultats expérimentaux (bleu clair) sont la moyenne $\pm$ SEM de deux expériences indépendantes. Le modèle (bleu foncé) est le résultat de l'analyse cosinor (cf. chapitre 5). <b>C</b> Activité de la TOP1, un point de donnée pour chaque CT. . . . .	65
2.8	<b>Rythme circadien de la quantité de protéines de TOP1 liée à l'ADN en présence de CPT11, dans des cellules Caco-2 synchronisées.</b> Les barres représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes ( $\pm$ SEM), après exposition au CPT11 à CT14 et CT28. La courbe continue représente la variation circadienne de la quantité de complexes sur l'ADN (somme des variables <i>DNATOP1</i> , <i>Compl</i> et <i>Icompl</i> ) simulée par le modèle mathématique de la PK-PD du CPT11, calibré aux données comme décrit à la section 2.4. . . . .	66
2.9	<b>Variation circadienne de l'apoptose après exposition au CPT11 des cellules Caco-2 synchronisées. A</b> Exposition à 25 $\mu$ M, <b>B</b> Exposition à 50 $\mu$ M. Mesure de l'apoptose 24 et 48 h après une exposition d'une heure au CPT11 débutant à CT14 ou CT28. Les résultats sont la moyenne ( $\pm$ SEM) de 6 points de données provenant d'une expérience. . . . .	67
2.10	<b>Vitesse d'efflux du CPT11</b> Les points correspondent à l'évaluation du membre de gauche de l'équation 2.16 à chaque point de temps (et donc à chaque concentration intracellulaire de CPT11), des expériences d'exposition à 10, 40 et 115 $\mu$ M de CPT11. La courbe continue est la représentation du membre de droite pour les valeurs optimales des paramètres $V_{effCPT}$ et $K_{effCPT}$ , déterminées par la méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5). . . . .	69
2.11	<b>Optimisation théorique de l'exposition au CPT11 des cellules cancéreuses.</b> Efficacité sur les cellules non synchronisées, en fonction de la dose cumulée de CPT11 et de la durée d'exposition. Les points blancs représentent la durée maximisant les dommages à l'ADN, pour chaque dose. . . . .	75

2.12	<b>Optimisation théorique de l'exposition au CPT11 des cellules saines.</b> Toxicité du CPT11 sur les cellules saines, en fonction de la durée d'exposition et du temps circadien de début d'exposition. La dose cumulée de CPT11 est fixée à 500 $\mu$ M.h. . . . .	76
2.13	<b>Optimisation théorique de l'administration chronomodulée du CPT11 dans les cellules Caco-2.</b> <b>A :</b> rythmes circadiens simulés des quantités de protéines de CES (vert), UGT (bleu), ABC_CPT (rouge) et ABC_SN (orange). <b>B :</b> schémas d'exposition optimaux, en suivant la stratégie thérapeutique de maximiser le dommage à l'ADN dans les cellules cancéreuses, sous une contrainte de toxicité maximale. Les schémas optimaux consistent en l'administration d'une dose cumulée de CPT11 écrite en vert, sur une durée comprise entre 3h40 et 7h10, commençant 1h30 à 1h50 avant le creux d'activité des CESs. . . . .	78
2.14	<b>Mécanisme d'induction des transporteurs d'efflux par le CPT11</b> Le CPT11 dans le milieu extracellulaire ( $CPT_{out}$ ) entre passivement dans le cytoplasme ( $CPT_{in}$ ). Il est ensuite expulsé hors des cellules par des pompes d'efflux appelées transporteurs ABC. $CPT_{in}$ induit des dommages à l'ADN responsable de l'activation de facteurs nucléaires qui promeuvent l'expression des transporteurs ABC. Cette augmentation de l'efflux du médicament a pour conséquence une diminution de sa concentration intracellulaire et donc de son efficacité. . . . .	83
2.15	<b>Maximiser le dommage à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sans contrainte de tolérabilité.</b> Évolution temporelle des concentrations extra et intracellulaires de CPT11 et SN38, de la quantité de protéines des transporteurs ABC_CPT, et des dommages à l'ADN $I_{compl}$ durant 168 h d'exposition à 3000 $\mu$ M de CPT11 administré seul (noir), combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires (rouge), ou à des inhibiteurs de transporteurs ABC (bleu). Ce schéma d'exposition au CPT11 est celui qui maximise le dommage à l'ADN pour les trois combinaisons de médicaments. Lorsque le CPT11 est administré seul, les cellules cancéreuses augmentent leur expression de transporteurs ABC, ce qui provoque une diminution des concentrations intracellulaires de CPT11 et de SN38, et donc des dommages à l'ADN induits. La co-administration d'inhibiteurs de facteurs nucléaires ou de transporteurs ABC empêche la surexpression des pompes d'efflux, augmentant ainsi les cassures simple ou double brin sur l'ADN. . . . .	87

2.16	<b>Maximiser les dommages à l'ADN dans une population de cellules cancéreuses, sous une contrainte de tolérabilité.</b> Schémas d'exposition optimaux pour trois stratégies thérapeutiques : exposition au CPT11 administré seul (noir), combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires (rouge), ou combiné à des inhibiteurs de transporteurs ABC (bleu). <b>A.</b> Dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses, en fonction du seuil de tolérabilité dans les cellules saines : les combinaisons du CPT11 avec des inhibiteurs de facteurs nucléaires ou de transporteurs ABC annihilent la résistance au CPT11 des cellules cancéreuses. <b>B.</b> Concentrations optimales de CPT11, en fonction du seuil de tolérabilité : les concentrations optimales diminuent d'approximativement 50 % lorsque le CPT11 est combiné à des inhibiteurs de facteurs nucléaires, par rapport à son administration seul. Combiner le CPT11 avec des inhibiteurs de transporteurs ABC permet une encore plus importante diminution des concentrations optimales. . . . .	89
2.17	<b>Quantité d'ARN messagers des principaux transporteurs d'efflux du CPT11, en présence (rouge) et absence (bleu) du médicament.</b> Les résultats présentés sont la moyenne ( $\pm$ SEM) de deux points de données provenant d'une même expérience. . . . .	92
2.18	<b>Estimation des paramètres et validation du modèle mathématique de l'équilibre des formes lactone et carboxylate du CPT11</b> <b>1</b> : évolution temporelle de la transformation de la forme carboxylate en forme lactone à pH 4 ( $\circ$ ), 5 ( $\bullet$ ) et 6 ( $\square$ ). <b>2</b> : évolution temporelle de la transformation de la forme lactone en forme carboxylate à pH 6 ( $\blacksquare$ ), 7 ( $\square$ ), 8 ( $\bullet$ ) et 9 ( $\circ$ ). <b>3</b> : Rapport de la forme lactone sur la quantité totale de CPT11 à l'équilibre, en fonction du pH. Les données expérimentales proviennent de [26]. . . . .	95
3.1	<b>Modèle mathématique "corps entier" de la PK-PD du CPT11.</b>	99
3.2	<b>Variations circadiennes des protéines de la pharmacologie du CPT11, chez la classe 2</b> Les points de données sont la moyenne de 10 à 15 animaux ( $\pm$ SEM). L'équation 2.11 a été calibré aux résultats expérimentaux par une méthode de moindres carrés (cf. chapitre 5). Les valeurs de paramètres obtenues sont présentées au tableau 3.3. . . . .	110
3.3	<b>Pharmacocinétique sanguine et tissulaire du CPT11 chez la classe 2, après injection de CPT11 à ZT11 (bleu) et ZT23 (rouge).</b> Les points de données représentent la moyenne de 10 à 15 souris, ( $\pm$ SEM). Les courbes continues représentent les simulations du modèle calibré aux données par une méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5). . . . .	112
3.4	<b>Pharmacocinétique sanguine et tissulaire du SN38 chez la classe 2, après injection de CPT11 à ZT11 (bleu) et ZT23 (rouge).</b> Les points de données représentent la moyenne de 10 à 15 souris, ( $\pm$ SEM). Les courbes continues représentent les simulations du modèle calibré aux données par une méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5). . . . .	113

4.1	<b>Protéines de la famille BCL2 présentes dans les cellules NIH-3T3 contrôles ou transformées v-src, en conditions non-apoptotiques.</b> 10000g <i>SN</i> : protéines dans le cytoplasme; <i>Mito. pellet</i> : protéines faiblement liées aux mitochondries; <i>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pellet</i> : protéines insérées dans la MME. Figure adaptée de [114]. . . . .	123
4.2	<b>Cinétique de BIK en conditions normales</b> Les protéines <i>BIK</i> sont phosphorylées ( <i>BIK<sub>p</sub></i> ) avant leur ubiquitination et dégradation par le protéasome. Cette phosphorylation s'effectue spontanément dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux, et est augmentée sous l'activité enzymatique des tyrosines kinases SRC dans les cellules transformées v-src. . . . .	124
4.3	<b>Dégradation de la protéine BIK dans les fibroblastes NIH-3T3 parentaux et transformés v-src.</b> Les points représentent les résultats expérimentaux de [114]. Les lignes continues sont les simulations du modèle mathématique (Équations 4.1 et 4.2), calibré aux données par la méthode des moindres carrés (cf chapitre 5). . . . .	125
4.4	<b>Évolution de la protéine BIK en réponse à un stress apoptotique. A</b> Immunoblot de la quantité de BIK après une exposition à la staurosporine durant 2, 4 et 6 h. <b>B</b> Localisation de BIK dans les cellules normales NIH-3T3 en absence de médicament et après une exposition à la staurosporine de 2 h. Les mitochondries sont marquées par un Mitotracker (rouge). BIK endogène a été marqué par un anti-BIK-BH3 et révélé par un anticorps secondaire marqué FITC (vert) (cf. chapitre 6). La couleur jaune indique la colocalisation. . . . .	127
4.5	<b>Réactions considérées de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules NIH-3T3.</b> En réponse à un stress apoptotique, <i>BIK</i> se relocalise aux mitochondries ( <i>BIK<sub>mito</sub></i> ) et inhibe l'activité anti-apoptotique de <i>BCL2</i> sur les protéines BH3 activatrices <i>BH3<sub>a</sub></i> . Les molécules libres de <i>BH3<sub>a</sub></i> activent ensuite les protéines <i>BAX<sub>inact</sub></i> en <i>BAX<sub>link</sub></i> qui peuvent désormais se lier fortement à la MME. Les molécules de <i>BAX<sub>link</sub></i> s'oligomérisent ensuite entre elles et avec les molécules de BAX déjà oligomérisés ( <i>BAX<sub>oligo</sub></i> ), dans un processus autocatalytique. Les protéines <i>BAX<sub>oligo</sub></i> créent des pores dans la MME qui permettent le relargage du cytochrome C dans le cytosol, menant ainsi la cellule à l'apoptose. Les protéines <i>BCL2</i> sont également capables d'inhiber <i>BAX<sub>link</sub></i> et <i>BIK<sub>mito</sub></i> . . . . .	128
4.6	<b>Simulation de la réponse des fibroblastes normaux (bleu) et transformés (orange) durant une exposition de 8 h à la staurosporine</b> La concentration totale de BIK au RE est supérieure dans les cellules normales et a pour conséquence une plus grande quantité de BIK aux mitochondries ( <i>BIK<sub>mito</sub></i> ) et de molécules <i>BH3<sub>a</sub></i> libérées. Les protéines <i>BH3<sub>a</sub></i> activent ensuite <i>BAX<sub>inact</sub></i> en <i>BAX<sub>link</sub></i> qui s'oligomérisent pour former des molécules de <i>BAX<sub>oligo</sub></i> , jusqu'à dépassé le seuil apoptotique dans les cellules normales, mais pas dans les cellules cancéreuses. . . . .	133



4.7	<b>Pourcentage de cellules apoptotiques dans les fibroblastes normaux (bleu) et transformés v-src (orange)</b> Les points sont les mesures expérimentales de [114] pour une exposition à la staurosporine administrée seule, ou combinée à l'herbimicine, et des données originales pour l'exposition à la staurosporine combinée à l'ABT-737. Les barres sont les résultats de simulations du modèle mathématique de l'apoptose par voie mitochondriale, calibré aux données par la méthode des moindres carrés (cf. chapitre 5). . . . .	135
4.8	<b>Simulation de la réponse des cellules normales (bleu) et cancéreuses (orange) à la stratégie théoriquement optimale.</b> La stratégie optimale consiste en l'administration de la staurosporine après exposition à quatre agents : un inhibiteur de SRC qui annihile la phosphorylation de BIK dans les cellules cancéreuses, un répresseur de BAX administré de sorte que la concentration de BAX dans les cellules normales soit en-dessous du seuil apoptotique, un répresseur de BCL2, et un activateur de $BH3_a$ . Cette combinaison médicamenteuse aboutit à une valeur de $BAX_{oligo}$ qui reste sous le seuil d'apoptose dans les cellules saines, et qui le dépasse dans les cellules cancéreuses. . . . .	137
5.1	<b>La formule du cosinor</b> . . . . .	144



# Liste des tableaux

2.1	<b>Valeurs de paramètres des expressions circadiennes de gènes dans des cellules Caco-2 synchronisées.</b> Moyenne $\pm$ SD, estimée en calibrant l'équation 2.15 aux données expérimentales par une méthode de bootstrap (cf. chapitre 5), a.u.= arbitrary units. . . . .	63
2.2	<b>Paramètres du modèle de la PK-PD moléculaire du CPT11 dans les cellules Caco-2.</b> Moyennes $\pm$ SD estimées par comparaison aux données expérimentales (cf. partie 2.4), en utilisant une approche de bootstrap (cf. chapitre 5). . . . .	73
3.1	<b>Équations du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11.</b> <i>int</i> signifie intestin, <i>lum</i> signifie lumière intestinale, <i>moel</i> signifie mœlle osseuse. Les flux sont décrits au tableau 3.2. . . . .	103
3.2	<b>Flux des équations du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11 .</b> Les équations sont présentées au tableau 3.1, les valeurs de paramètres au tableau 3.4 . . . . .	106
3.3	<b>Valeurs des paramètres circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11, pour la classe 2.</b> Valeurs estimées par la méthode des moindres carrées. u.a. = unités arbitraires . . . . .	109
3.4	<b>Valeurs des paramètres du modèle "corps entier" de la PK-PD du CPT11</b> Les paramètres ont été estimés par une méthode des moindres carrées, en utilisant l'algorithme CMAES pour la tâche de minimisation (cf. chapitre 5) . . . . .	115
3.5	<b>Paramètres des rythmes circadiens des protéines de la pharmacologie du CPT11.</b> Les paramètres sont estimés à partir des données de PK sanguine et tissulaire. . . . .	116
4.1	<b>Valeurs de paramètres du modèle de la voie mitochondriale de l'apoptose.</b> Les paramètres ont été estimés à partir des données expérimentales de la littérature et des résultats sur les cellules NIH-3T3 de [114]. . . . .	130

4.2	<b>Simulations de la toxicité et de l'efficacité d'une exposition de 8 h à la staurosporine, après administration des différentes combinaisons médicamenteuses</b>	Les stratégies thérapeutiques étudiées consiste en l'administration de staurosporine, précédée d'une exposition aux agents indiqués dans la première colonne. BAX= répresseur de BAX, BCL2 = répresseur de BCL2, $BH3_a$ = activateur de $BH3_a$ , SRC = inhibiteur de SRC. Les valeurs exposées sont celles de $n(t)$ après 8 h d'exposition à la staurosporine, dans les cellules normales et cancéreuses. Les lignes en bleu sont les stratégies qui aboutissent à une efficacité d'environ 99%, et d'une toxicité inférieure à environ 1% . . . . .	138
-----	--	---	-----



## Résumé

Personnaliser les traitements anticancéreux sur base moléculaire consiste à optimiser la thérapie en fonction des profils d'expression de gènes des cellules saines et tumorales du patient. Les différences au niveau moléculaire entre tissus normaux et cancéreux sont exploitées afin de maximiser l'efficacité du traitement et minimiser sa toxicité. Cette thèse propose une approche pluridisciplinaire expérimentale et mathématique ayant pour but la détermination de stratégies anticancéreuses optimales sur base moléculaire. Cette approche est, tout d'abord, mise en œuvre pour la personnalisation de la chronothérapeutique des cancers, puis pour l'optimisation de la thérapie anticancéreuse dans le cas d'une mutation de l'oncogène SRC.

## Mots clés

optimisation thérapeutique, cancer, modélisation mathématique, biologie systémique, pharmacocinétique-pharmacodynamie moléculaire, rythme circadien, irinotecan, SRC.

### Equipe-projet BANG INRIA de Rocquencourt

Domaine de Voluceau, BP. 105

78153 Le Chesnay Cedex

<http://www-rocq.inria.fr/bang/>

et

### Laboratoire « Rythmes biologiques et cancer », INSERM U776 et Université Paris 11

Hôpital Paul-Brousse

14, Av. Paul-Vaillant-Couturier

94807 VILLEJUIF Cedex

<http://rbc.vjf.inserm.fr>

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex