

## **Rythmes biologiques et chronothérapeutique : comparaison entre des schémas d'administration théoriques et des thérapeutiques appliquées en cancérologie**

Daniel Claude\*, Jean Clairambault\*\* et Francis Lévi\*\*\*

\* Université Paris XI et INRIA - Rocquencourt ; E-mail : Daniel.Claude@lss.supelec.fr

\*\* Université Paris VIII et INRIA - Rocquencourt ; E-mail : Jean.Clairambault@inria.fr

\*\*\* Université Paris XI et Hôpital Paul Brousse ; E-mail : frlevi@club-internet.fr

### **Résumé**

À l'aide du modèle proposé par A. Goldbeter pour décrire les oscillations circadiennes de la protéine PER chez la Drosophile, D. Claude et J. Clairambault ont mis en évidence que, parmi les schémas d'administration usuels en pharmacocinétique, le seul qui était à même de déplacer convenablement le rythme endogène des différents mutants, en jouant sur la fréquence de traduction de l'ARN-messager, était le schéma d'administration intermittent périodique. De plus, ce schéma d'administration, par stimulation activatrice ou inhibitrice, bien qu'il définisse une loi de commande en boucle ouverte, réalise un entraînement 1-1 du modèle et possède ainsi des qualités de robustesse vis-à-vis des erreurs en amplitude, en phase et en période. Il permet de déplacer en théorie le rythme endogène de divers mutants pour obtenir un rythme résultant proche du rythme endogène de l'insecte sauvage. Ceci suggère comment, dans d'autres contextes, certaines pathologies associées à une modification de rythmes pourraient être traitées par l'administration périodique d'agents pharmacologiques. Il est à cet égard tout à fait remarquable que des schémas périodiques d'administration intermittente de chimiothérapie soient utilisés actuellement en cancérologie pour traiter les cancers colorectaux. Ces protocoles ont été appliqués à près de 1500 patients cancéreux dans le cadre d'essais cliniques contrôlés. Ils se sont révélés plus efficaces qu'une perfusion constante dans 2 essais randomisés multicentriques portant sur un total de 278 patients (taux de réponses objectives tumorales : chronothérapie, 50 % ; perfusion constante : 30 % ;  $p < 0.001$ ). De plus, la survie des patients recevant la chronothérapie est supérieure de près de 6 mois à celle rapportée pour les traitements conventionnels (chronothérapie : 16 à 21 mois, traitements conventionnels : 10 à 17 mois), suggérant un effet bénéfique d'une administration chronomodulée rythmée sur 24 heures.

Nous proposons ainsi d'utiliser les résultats des simulations sur le modèle des oscillations de la protéine PER pour expliquer certaines propriétés thérapeutiques spécifiques des schémas chronomodulés et d'optimiser ceux-ci en fonction des caractéristiques des rythmes.

## 1. Introduction

Les systèmes biologiques sont par nature non linéaires et présentent souvent à l'observation des comportements oscillatoires qui sont de plus périodiques et stables. En particulier, des rythmes circadiens ont été observés chez bien des végétaux, des animaux et chez l'homme [1, 9, 22, 24, 42, 44, 46, 47]. Certaines pathologies dénommées « dynamical diseases » par L. Glass et al. [2], sont associées à une altération de rythmes qui peut résulter d'une mutation génétique ayant pour effet de modifier certaines oscillations biochimiques et certains rythmes cellulaires [22], comme c'est le cas chez la Drosophile. Dans des articles antérieurs [12, 13] et dans un contexte biologique différent, l'un des auteurs, en complément des travaux de E. Bernard-Weil [4, 5, 6], avait déjà considéré le problème de déplacer le comportement d'un système pathologique pour le rapprocher d'un comportement physiologique, mais la réalisation effective des lois de commande trouvées n'avait pas été considérée sous l'angle de la pharmacocinétique appliquée. Dans un article récent D. Claude et J. Clairambault [14], ont privilégié le point de vue inverse. Ils ont considéré le problème de déplacer le rythme endogène altéré de production de la protéine PER chez un mutant de la Drosophile pour le rapprocher du rythme de l'insecte « sauvage », considéré comme « normal », et dans ce dessein d'utiliser des schémas d'administration usuels en pharmacocinétique appliquée.

## 2. Les schémas d'administration théoriques

Dans un article récent [21], A. Goldbeter a proposé un modèle pour représenter les oscillations circadiennes de la protéine PER chez la Drosophile. Ce modèle biochimique, qui relève du cadre conceptuel activation-inhibition, décrit le cycle de production et de dégradation des différentes formes, phosphorylées ou non, de la protéine PER et de ses précurseurs nucléaires.

À l'aide d'un portrait de phase dans le plan  $(M, P_t)$  où  $M$  désigne l'ARN-messager et  $P_t$  la protéine totale, sous toutes ses formes, on peut observer le comportement oscillatoire du cycle de production de la protéine PER dont le régime permanent est donné par une courbe fermée représentant un cycle limite stable qui est une caractéristique géométrique du système (cf. [22]). Les mutations du gène *per* ont pour conséquence de modifier la période endogène circadienne du régime permanent de  $P_t$ , qui peut ainsi varier de 18 heures pour le mutant *per<sup>T</sup>* à 28 heures 30 pour le mutant *per<sup>l</sup>*.

Dans un autre article [28], J.-C. Leloup et A. Goldbeter ont montré que ce système dynamique est naturellement couplé à celui qui modélise les oscillations de la protéine TIM qui

présente aussi un rythme circadien et est sous l'influence plus directe des rythmes lumineux. Cependant pour expliquer l'approche suivie, il suffit de considérer le modèle le plus simple ne comportant que la protéine PER. Les différentes Drosophiles, mutantes et non mutantes (Drosophile « sauvage »), sont caractérisées par des valeurs différentes d'un paramètre  $v_d$ , associé à la vitesse de dégradation de la protéine PER ; les autres paramètres du modèle ayant la même valeur quel que soit le mutant.

Nous supposons que le paramètre  $v_d$ , qui représente une composante « génétique » du modèle, ne peut être modifié par aucun moyen pharmacologique ou physico-chimique. Un changement de température aurait pu être envisagé, mais les autres paramètres du système seraient alors aussi modifiés (cf. [27]) et puisque les paramètres du modèle ne sont pas donnés explicitement en fonction de la température, il n'est pas possible de prévoir l'influence d'un changement de température sur la période du rythme endogène de production de la protéine PER.

D'un point de vue théorique, comme il s'agit d'un système bouclé sur lui-même, il est a priori envisageable d'agir au début de chaque maillon de la chaîne biochimique, mais en fait, si on exige des qualités de robustesse vis-à-vis des erreurs qui seront inévitablement présentes lors de l'application d'un schéma d'administration, toutes les actions ne sont pas équivalentes. Par exemple, une action sur la vitesse de transcription de l'ADN en ARN-messenger, qui représente une cible pharmacologique plausible et efficace, se montre trop sensible à de petites variations et par conséquent aux erreurs et aux incertitudes. Ainsi, une action à ce niveau ne peut pas conduire à une commande robuste en particulier vis-à-vis des erreurs en amplitude des stimulations et ne semble donc pas devoir être retenue. Par contre, la fréquence de traduction  $k_s$  de la protéine PER à partir de l'ARN-messenger, représente une cible pharmacologique plausible, beaucoup moins sensible aux erreurs d'administration et sur laquelle pourraient agir des activateurs ou des inhibiteurs chimiques.

Chacun des mutants considérés admet un cycle limite spécifique (voir la Figure 1) et l'objectif recherché est de déplacer, à l'aide d'une commande adéquate, le cycle limite d'un mutant pour le rapprocher autant que possible de celui du rythme de production de la Drosophile sauvage, considéré comme « normal ». Cependant, le rythme endogène de production de la protéine PER chez la Drosophile, sauvage ou mutante, naturellement forcé par le rythme lumineux jour-nuit, est par conséquent toujours ramené à 24 heures. Par conséquent, en ayant à l'esprit une possible application (au moins au niveau du paradigme) en pharmacocinétique appliquée grâce à un schéma d'administration quotidien le plus régulier possible, il semble judicieux de ramener la période du rythme endogène des mutants à 24 heures et non pas à celle de la drosophile sauvage qui est de 23,71 heures.

Ainsi, en première intention, le but de la commande sur le système non linéaire donné par le modèle, est d'obtenir, grâce à une modification adéquate du paramètre  $k_s$ , un rythme endogène proche de 24 heures pour chacun des mutants  $per^T$  et  $per^l$  de la Drosophile. Ensuite, si possible, la

commande a aussi pour objectif d'obtenir que les phases (pic et creux de la production totale de la protéine PER, comptés à partir de zéro et modulo 24 heures) et les amplitudes des oscillations des différentes variables dynamiques du modèle commandé de chaque mutante de Drosophile, soient aussi proches que possible des valeurs observées dans le modèle de la Drosophile non mutante.

Compte tenu des indications précédentes, on peut envisager différents types de commande correspondant à des schémas d'administration pris sur une durée de vingt-quatre heures et décrits par trois modes usuels en pharmacocinétique appliquée :

- a) *la perfusion continue,*
- b) *le bolus (le bolus pouvant être assimilé à une élévation quasi-instantanée de la concentration),*
- c) *la perfusion intermittente de durée strictement inférieure à 24 heures.*

De plus, dans le dessein d'obtenir une loi de commande qui bien qu'elle soit en boucle ouverte possède des qualités de robustesse vis-à-vis des erreurs en amplitude, en phase et en période, on recherche un schéma d'administration périodique, activateur ou inhibiteur, à même de réaliser un entraînement 1-1 du modèle.

#### **4. Les résultats théoriques**

L'objectif de la commande étant de voir apparaître assez rapidement une convergence vers un cycle limite, la durée totale d'administration a été en général prise égale à 9 jours, et occasionnellement égale à 18 jours ou, plus rarement, à 27 jours. Pour chacun des mutants (*per<sup>T</sup>* et *per<sup>L</sup>*), deux ensembles de conditions initiales ont été considérés : l'un correspondant à la valeur maximale (pic) atteinte par la protéine PER totale  $P_t$ , pour le cycle limite non contrôlé, l'autre associé à sa valeur minimale (creux).

En partant des valeurs paramétriques de chaque Drosophile mutante, les schémas d'administration, par activation ou inhibition, ont eu pour objet, comme indiqué plus haut, de modifier la fréquence  $k_s$  de traduction de l'ARN-messager en la forme non phosphorylée de la protéine PER.

Les stimulations activatrices ou inhibitrices sur le paramètre  $k_s$  ont été obtenues en ajoutant ou en retranchant à la valeur basale donnée par A. Goldbeter dans [21] ( $k_s = 0.78 \text{ h}^{-1}$ ), des valeurs constantes prises entre 0,2 et 2,0  $\text{h}^{-1}$  pour une stimulation activatrice et entre  $-0,2$  et  $-0,7 \text{ h}^{-1}$  pour une stimulation inhibitrice. Comme indiqué au paragraphe précédent, trois types de schémas

d'administration ont été appliqués : des stimulations constantes, des bolus quasi-instantanés de durée brève (3 ou 6 minutes) répétés toutes les 24 heures, des stimulations intermittentes appliquées avec une période de 24 heures et d'une durée effective de 1, 2, 3,4, 6, 8 ou 12 heures.

#### 4.1. Deux modes simples de commande : stimulation constante et bolus

Aucun de ces deux modes n'a permis d'atteindre l'objectif de ramener d'une façon robuste la période de variation de la protéine PER chez chacun des mutants à 24 heures.

a) Pour la stimulation constante, en considérant en premier la Drosophile mutante *per<sup>l</sup>* avec une valeur de  $v_d$  égale à  $2 \mu\text{M h}^{-1}$ , on observe qu'une stimulation activatrice obtenue en posant  $k_s = 0,78 + 0,5 = 1,28 \text{ h}^{-1}$  conduit à une période de 26,5 h, plus proche de 24 h que la période initiale, mais on constate que l'amplitude des oscillations est beaucoup plus grande que celle qui peut être mesurée sur le cycle limite de la Drosophile sauvage (avec  $v_d = 1,6 \text{ h}^{-1}$ ). Par contre, une stimulation inhibitrice obtenue en posant  $k_s = 0,78 - 0,5 = 0,28 \text{ h}^{-1}$  conduit à des oscillations d'amplitude réduite et un cycle limite de période 37,5 h (Fig. 2a). Ces oscillations sont ainsi incompatibles avec le cycle limite de la Drosophile sauvage dont on souhaite se rapprocher.

De même, en considérant en second la Drosophile mutante *per<sup>T</sup>* avec une valeur de  $v_d$  égale à  $0,5 \mu\text{M h}^{-1}$ , on observe qu'une stimulation activatrice obtenue en posant  $k_s = 0,78 + 0,5 = 1,28 \text{ h}^{-1}$  conduit à la suppression des oscillations (Fig. 2b), et une stimulation inhibitrice obtenue en posant  $k_s = 0,78 - 0,5 = 0,28 \text{ h}^{-1}$  conduit à une période de 22,6 h, avec des oscillations d'amplitude très réduite.

Dans les deux cas, en balayant par pas de 0,1 les intervalles choisis pour les stimulations, on ne trouve aucune solution satisfaisante et jamais la périodicité de 24 heures recherchée par stimulation constante n'est obtenue dans ce cadre. Cependant, avec la Drosophile *per<sup>T</sup>* en prenant  $k_s = 0,78 - 0,5375 = 0,2425 \text{ h}^{-1}$ , on trouve cette fois-ci un cycle limite de période exactement 24 h. Ce résultat malheureusement ne peut pas être retenu pour deux raisons. La première est due au fait qu'une telle commande exige une trop grande précision, incompatible avec un objectif de pharmacocinétique appliquée. La seconde raison tient au fait qu'une légère variation de la commande entraîne un déplacement de la période d'une manière plus ou moins sensible suivant les propriétés du système dynamique non linéaire donné par le modèle.

Ainsi, soit il n'existe pas de commande par stimulation constante, soit une telle commande n'est pas robuste.

b) Pour les bolus périodiques de durée de 3 ou 6 minutes effectués sur chaque période de 24 heures, aucune stimulation activatrice ou inhibitrice, quelles que soient son amplitude et sa phase (pic ou au creux du cycle non contrôlé), n'a permis d'obtenir une déviation significative du cycle limite initial, indépendamment du mutant considéré. Ceci illustre vraisemblablement la forte attractivité du cycle limite de chacun des mutants *per<sup>T</sup>* ou *per<sup>l</sup>*.

## 4.2. Entraînement par stimulation périodique intermittente

Finalement, compte tenu du manque de résultats des deux précédents schémas d'administration, une stimulation périodique intermittente, activatrice ou inhibitrice, a été appliquée au modèle suivant les modalités indiquées pour la commande intermittente. On constate alors que pour les deux mutants et aussi bien dans le cas d'une stimulation activatrice que dans celui d'une stimulation inhibitrice, on est à même d'obtenir un bon entraînement à la période prescrite de 24 heures pour des zones particulières d'amplitude du stimulus et du temps effectif de stimulation. L'existence de telles zones (et pas seulement de valeurs bien définies) assure une robustesse naturelle aux schémas de commande par stimulation intermittente vis-à-vis des erreurs de période, d'amplitude, de durée de stimulation et de phase initiale (pic ou creux ou autre). À l'extérieur de ces intervalles, on peut observer des comportements variés allant du maintien de la période initiale du mutant à des apparents doublements de période avec un cycle limite ayant la forme d'un huit invaginé (Limaçon de Pascal), jusqu'à des comportements transitoires de type chaotique.

Pour *per<sup>l</sup>* (voir Fig. 3a et Tableaux 1a et 1b), les stimulations activatrices montrent des résultats supérieurs aux stimulations inhibitrices, avec un bon entraînement 1-1, un cycle limite contrôlé d'amplitude satisfaisante et des transitoires rapides et d'amplitudes équivalentes à celles qui sont obtenues en régime permanent sur le cycle limite. L'entraînement 1-1 peut être réalisé dès une heure d'activation, mais à condition de prendre un stimulus d'amplitude assez grand ( $1,5 \text{ h}^{-1}$  ou  $2 \text{ h}^{-1}$ ). Il est maintenu jusqu'à 12 heures de stimulation mais avec une amplitude beaucoup plus faible (de  $0,3$  à  $0,7 \text{ h}^{-1}$ , pour des durées de 12, 8 et 6 heures). Quant aux stimulations inhibitrices, elles exigent au moins 4 heures de stimulation avec une amplitude variant de  $-0,3 \text{ h}^{-1}$  jusqu'à  $-0,4 \text{ h}^{-1}$ , pour 12 heures. Enfin, à part le cas des durées de stimulation les plus longues (8 ou 12 heures), on remarque de meilleurs transitoires, en amplitude et en durée, si on initialise la commande à l'instant du pic plutôt qu'à celui du creux de production de la protéine PER totale.

Pour la Drosophile mutante *per<sup>T</sup>* (voir Fig. 3b et Tableaux 2a et 2b), au contraire, les stimulations intermittentes inhibitrices donnent de meilleurs résultats que les stimulations activatrices. L'entraînement 1-1 est réalisé par des stimulations inhibitrices d'une durée de

seulement 4 heures (contre 6 heures pour une stimulation activatrice) et pour une amplitude variant dans un intervalle réduit ( $-0,4$  à  $-0,5 \text{ h}^{-1}$  pour des durées d'exposition longues : 6, 8 et 12 heures). L'entraînement 1-1 est obtenu par une stimulation activatrice pour des amplitudes supérieures à 1. L'initialisation de la commande au pic donne en général de meilleurs résultats qu'au creux, avec des transitoires bien plus courts et les amplitudes des oscillations des transitoires comme celles des régimes permanents sont assez proches de celles qui sont observées sur le cycle limite de la *Drosophile* sauvage.

1 h	-	-	-	-	-	1,5	2
2 h	-	-	-	0,7	1	1,5	-
3 h	-	-	-	0,7	1	-	-
4 h	-	-	0,5	0,7	1	-	-
6 h	0,3	0,4	0,5	0,7	-	-	-
8 h	0,3	0,4	0,5	-	-	-	-
12 h	0,3	0,4	-	-	-	-	-

1 h	-	-	-	-	-
2 h	-	-	-	-	-
3 h	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-0,7
6 h	-	-	-	-0,5	-0,7
8 h	-	-0,35	-0,4	-0,5	-0,7
12 h	-0,3	-0,35	-0,4	-	-

**Tableaux 1a et 1b :** stimulation périodique avec une période de 24 h appliquée sur le mutant *per*<sup>1</sup>. Durée d'exposition versus amplitude de la stimulation activatrice (valeurs positives) ou inhibitrice (valeurs négatives) dans le cas d'un entraînement 1-1 de bonne qualité.

4 h	-	-	-
6 h	-	-	2
8 h	-	1,5	2
12 h	1,2	1,5	-

4 h	-	-	-	-0,6
6 h	-	-0,45	-0,5	-
8 h	-0,4	-0,45	-	-
12 h	-0,4	-0,45	-	-

**Tableaux 2a et 2b :** stimulation périodique avec une période de 24 h appliquée sur le mutant *per*<sup>T</sup>. Durée d'exposition versus amplitude de la stimulation activatrice (valeurs positives) ou inhibitrice (valeurs négatives) dans le cas d'un entraînement 1-1 de bonne qualité.

## 5. Commentaires sur les schémas d'administration théoriques

Il n'a pas été possible d'obtenir que le cycle limite commandé ait une période de 24 heures, ou alors d'une façon non robuste, lorsque les stimulations étaient soit constantes ou soit formées d'un bolus périodique de période 24 heures. En effet, mathématiquement, suivant l'amplitude du

changement permanent d'un paramètre, on observe soit une déformation du cycle limite et par conséquent un décalage de la période ou même une bifurcation du système dynamique. De plus, dans une zone paramétrique donnée, l'ensemble des valeurs paramétriques qui conduisent à une période fixée du cycle limite est un ensemble de mesure nulle ne pouvant donc permettre une commande robuste. Il était donc normal de ne pas trouver une commande par stimulation constante. Quant aux bolus, ils produisent usuellement des décalages de phase (cf. [47]) et l'application d'un bolus périodique sur un système admettant un cycle limite fortement attracteur ne pouvait elle non plus conduire au fort décalage de période nécessaire pour passer de 18 h à 24 h ou de 28,5 h à 24 h.

L'utilisation de l'entraînement pour obtenir la période souhaitée restait donc la seule possibilité à prendre parmi les divers schémas retenus. L'existence de zones d'entraînement permettant alors d'assurer la robustesse cherchée vis-à-vis des erreurs de période, d'amplitude, de durée de stimulation et de phase initiale (pic ou creux ou autre). De plus l'examen des sonde d'entraînement suggère la possibilité d'une « loi des aires », qui amènerait, dans le cadre de la pharmacocinétique appliquée, à définir une dose journalière, d'une substance activatrice ou inhibitrice de la réaction sur laquelle on souhaite intervenir. On obtiendrait ainsi l'entraînement 1-1 cherché seulement dans le cas où la dose délivrée sur 24 h (définie ici par le produit de l'amplitude avec la durée de la stimulation) appartiendrait à « un intervalle d'efficacité ». À l'extérieur de cet intervalle, on observerait des types variés de comportement inadaptés : des transitoires trop longs, un cycle limite commandé identique au cycle original du mutant et par conséquent aucun déplacement de période vers 24 h et aucun entraînement 1-1, ou encore un cycle limite commandé avec une amplitude ou une forme bien trop différentes du cycle limite « physiologique » de la *Drosophile* sauvage, des doublements de périodes (48 h) ou même des trajectoires erratiques, toutes choses usuelles des comportements dynamiques non linéaires forcés.

Le fait de commencer la stimulation au pic ou au creux donne souvent le même entraînement, mais avec des transitoires parfois bien différents et l'on peut observer dans certains cas des transitoires très longs ou très perturbés lorsque l'initialisation (pic ou creux) est mal adaptée.

Ainsi, seul un choix attentif de la commande définie par l'amplitude du stimulus, activateur ou inhibiteur, la durée de la stimulation et des conditions initiales adaptées, peut conduire à un entraînement à la fréquence prescrite de 24 heures. Mais, une fois que la dose journalière est bien adaptée, on peut remarquer qu'il reste encore la possibilité, pour une même dose journalière, de jouer sur l'amplitude ou la durée pour réaliser aussi un décalage de phase. Par exemple, pour la *Drosophile* mutante *per<sup>l</sup>*, on obtient un bon entraînement pour une dose journalière obtenue soit avec un stimulus activateur de  $0,8 \text{ h}^{-1}$  durant 3 heures, ou bien un stimulus activateur de  $0,6 \text{ h}^{-1}$  pendant 4 heures, ou encore un stimulus activateur de  $0,4 \text{ h}^{-1}$  pendant 6 heures, chacun de ces stimulus conduisant en régime permanent au pic de  $P_t$  à des temps respectifs de 8,27 h, 8,85 h et



10,27 h, modulo 24 heures à partir du moment d'initialisation de la commande. En outre, en régime permanent, la phase du pic de  $P_t$  est indépendante du choix de la condition initiale, pic ou creux de  $P_t$ .

## **6. Chronopharmacologie et chronothérapie cliniques**

On observe que la concentration plasmatique du 5-fluorouracile varie de plus de 50% selon un rythme circadien malgré sa perfusion à débit constant, même en présence d'une co-perfusion d'acide folinique et d'oxaliplatine à débit constant [41, 37.] La variation de la résistance cellulaire au 5-FU au cours des 24 h résulte pour partie du rythme de l'activité de la dihydropyrimidine déshydrogénase, une enzyme qui catabolise cet antimétabolite. Son activité dans les mononucléaires sanguins est en moyenne de 40% plus élevée à minuit qu'à 10:00 chez 12 patients atteints de métastases de cancer colorectal [26].

### **6.1. Adaptation de la chimiothérapie aux rythmes circadiens chez les patients atteints de cancer**

L'équipe du Laboratoire "Rythmes biologiques et Chronothérapeutique" de l'hôpital Paul Brousse à Villejuif, a conduit des essais de Phase I, II et III de chronothérapie au cours de ces 10 dernières années chez près de 1200 patients atteints de métastases de cancer du côlon avec le 5-fluorouracile, l'acide folinique et/ou l'oxaliplatine. Ces essais thérapeutiques ont montré, pour la première fois, la haute activité thérapeutique de cette triple association, d'abord développée en chronomodulation afin d'en accroître d'emblée la sécurité d'utilisation.

En Phase I, une perfusion veineuse chronomodulée a permis d'augmenter de 30% ou davantage la dose tolérée d'oxaliplatine (l-OHP) et de 5-fluorouracile (5-FU) [11, 8, 33, 15]. Les résultats obtenus ont justifié la mise en oeuvre des essais de Phase II de chronomodulation dans le but d'en préciser l'activité antitumorale (définie par le taux de réponses, ou proportion de patients présentant une diminution de plus de 50% de la taille des métastases).

L'activité antitumorale intrinsèque du l-OHP a été tout d'abord mise en évidence par notre groupe, puis confirmée dans d'autres essais de Phase II [33, 36]. Il s'agit du premier complexe de platine actif contre les métastases de cancer colorectal, qui a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché dans cette indication en 1996. Son association chronomodulée avec le 5-FU et l'acide

folinique (AF) a permis de doubler, puis de tripler le taux de réponses tumorales à la chimiothérapie des cancers colorectaux, grâce à l'augmentation de doses rendue possible par la bonne tolérance aux médicaments [29, 7, 34] .

La validation du principe de chronothérapie en Phase III constitue une étape indispensable à l'acceptation de cette méthode par la communauté médicale. Le Laboratoire "Rythmes biologiques et Chronothérapeutique" a mené, de Mai 1990 à Février 1993, 2 essais randomisés multicentriques consécutifs comparant l'association de 5-FU, d'AF et de I-OHP perfusés soit à débit constant, soit à débit chronomodulé chez un total de 278 patients atteints de cancer colorectal métastatique non antérieurement traité. Cet essai s'est déroulé selon les règles de Bonnes Pratiques Cliniques, avec notamment transmission des données en temps réel, comité indépendant d'évaluation des réponses et comités d'experts extérieurs à l'essai. Le schéma chronomodulé a occasionné 5 à 7 fois moins de mucites sévères et 2 fois moins de neuropathie périphérique sensitive que le schéma constant. De plus la chronothérapie s'est révélée plus active que la perfusion constante : le taux de réponses tumorales objectives, critère principal de jugement, était de 50% pour la chronothérapie et de 30% pour le schéma constant dans chacun de ces essais ( $p < 0.04$  et  $p < 0.003$ , respectivement). La survie médiane ne différait pas de façon statistiquement significative selon la modalité, mais elle était de 16 mois et excédait d'environ 50% celles rapportées dans les essais multicentriques pour des populations comparables. L'absence de différence de survie selon la modalité de perfusion peut s'expliquer par le fait que 25% des patients randomisés dans la modalité constante ont été traités par chronothérapie après échec et que la puissance statistique de l'essai ne permettait pas d'évaluer ce paramètre de façon adéquate, compte tenu de la multiplicité des facteurs cliniques et biologiques pronostiques de survie [35, 32].

Le rôle de l'heure du débit maximal de la chronomodulation de la triple association de 5-FU, d'AF et de I-OHP sur sa toxicité a été recherché chez 114 patients atteints de métastases de cancer colorectal. Huit modalités de perfusion chronomodulée, avec des pics de débit décalés de 3 h en 3 h ont été testées selon un plan semi-séquentiel. Les résultats montrent que les perfusions chronomodulées de 5-FU et de l'OHP avec pics respectifs de débit à 01:00 ou 04:00 et 13:00 ou 16:00 occasionnent la survenue de toxicité de grade 3-4 chez 16% des patients en comparaison de 80% lorsque le schéma est décalé de 12 h (pic de 5-FU à 16:00 et pic de I-OHP à 04:00) [23] . Les différences de tolérance peuvent résulter du fait que la chronomodulation du 5-FU et de l'AF avec un débit maximal à 04:00 permet un meilleur contrôle des concentrations plasmatiques [25].

En association avec d'autres laboratoires, un essai clinique multicentrique européen conduit de 1994 à 1996, a montré l'apport du I-OHP à l'administration chronomodulée de 5-FU-AF chez

200 patients atteints de métastases de cancer colorectal, confirmant ainsi l'activité de cette molécule, son synergisme avec l'association 5-FU-AF et la nécessité de la chronothérapie pour une administration ambulatoire de cette triple association [16, 17].

L'activité élevée de la chronothérapie permet la résection chirurgicale de métastases auparavant inopérables. Cette stratégie thérapeutique originale semble capable d'augmenter la survie de patients atteints de métastases de cancer colorectal. En effet, la médiane de survie de 151 patients, atteints de métastases hépatiques seules et traitées par chronothérapie avec cette triple association à l'hôpital Paul Brousse, est de 24 mois et, celle des 77 patients, chez qui une résection secondaire des métastases antérieurement inopérables a été tentée, est de 4 ans. Il s'agit des meilleurs résultats rapportés dans cette affection [18].

## **6.2. Perturbation possible des rythmes circadiens en cas de cancer**

Une revue de la littérature suggère que les processus cancéreux s'accompagnent d'une altération progressive du système circadien du sujet hôte, selon une séquence chronologique qui reste à définir [40].

Il apparaît ainsi que les rythmes de division cellulaire dans les tumeurs humaines (ovaire, lymphomes, cancers mammaires) sont maintenus lorsque le temps de doublement est long et/ou lorsque la tumeur est à un stade précoce de développement et/ou a conservé un degré élevé de différenciation. Au contraire, l'organisation circadienne tumorale est perturbée en cas de tumeur indifférenciée, aneuploïde ou avancée.

Chez 33 patientes atteintes de cancer avancé de l'ovaire ou du sein, des rythmes circadiens de groupe caractérisent la cortisolémie et la numération globulaire. Cependant, alors que ces rythmes persistent chez les patientes en bon état général et/ou avec une faible masse tumorale, ils sont fortement altérés chez les patientes en mauvais état général et/ou avec une masse tumorale importante [3, 45, 43]. Les altérations observées se caractérisent par un amortissement des rythmes, des déplacements de phase et/ou l'apparition de rythmes de période inférieure à 24 h.

Afin d'évaluer l'incidence de perturbations du système circadien associées au cancer, un enregistrement du cycle activité-repos a été effectué chez 200 patients atteints de métastases de cancer colorectal, à l'aide d'un bracelet d'actométrie porté pendant 3 jours. Rappelons que dans le modèle animal, le cycle activité-repos est un marqueur du fonctionnement des noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus. Les techniques d'analyses ont été adaptées à ce type

de données, ce qui a conduit à sélectionner le coefficient d'autocorrélation à 24 h comme critère d'évaluation de la puissance de la composante circadienne. Cet index circadien a montré à la fois une corrélation élevée avec le score global de qualité de vie (questionnaire de l'EORTC) et une valeur pronostique de survie hautement significative et surtout indépendante des facteurs cliniques à l'analyse multivariée [38, 39].

## 7. Conclusion

Le système de dimension réduite qui modélise la production rythmée de la protéine PER chez la *Drosophile* peut servir de paradigme général à la modélisation de nombreux systèmes biologiques dans lesquels interviennent les synthèses de diverses protéines. Il a été montré que la détermination d'une dose journalière adaptée permettait de déplacer la période d'un cycle « pathologique » pour la ramener vers la période « physiologique » à l'aide de stimulations intermittentes, activatrices ou inhibitrices, et en agissant sur trois facteurs : la dose totale journalière, la durée d'exposition et l'initialisation de l'administration. L'existence des zones d'entraînement permettant en outre d'assurer une robustesse naturelle aux commandes vis-à-vis des erreurs de période, d'amplitude, de durée de stimulation et de phase initiale (pic ou creux ou autre).

Un travail ultérieur pourrait améliorer les schémas d'administration intermittents en les complétant par un codage en fréquence ([19, 20]) et en recourant à des bouffées intermittentes qui représentent le mode de communication naturel entre les systèmes biologiques. Une autre amélioration consisterait à déterminer la forme de la stimulation intermittente la plus à même de minimiser l'écart entre le cycle limite pathologique contrôlé et le cycle limite physiologique, tout en restant dans le cadre de la pharmacocinétique appliquée.

La chronothérapie a jusqu'à présent principalement consisté en l'administration rythmée de médicaments dans le dessein d'améliorer la tolérance ou l'efficacité [30, 31]. Cependant, des altérations des rythmes biologiques ont été remarquées dans plusieurs pathologies et en particulier dans le cas de certaines pathologies cancéreuses [10, 40]. Il ne fait aucun doute que des stratégies chronothérapeutiques, basées sur le principe de schémas d'administration périodique de substances pharmacologiques, devraient pouvoir utiliser les pompes à injection programmable actuelles d'une manière encore plus efficace.

## Remerciements

*Cette recherche a reçu le soutien du GdR « Automatique » du CNRS.*

## Références

- [1] Boissin, J., Canguihem, B. 1998. Les rythmes du vivant. Origine et contrôle des rythmes biologiques. Nathan, Paris.
- [2] Bélair, J., Glass, L., an der Heiden, U., Milton, M. 1996. Dynamical disease: Identification, temporal aspects and treatment strategies of human illness. In: Bélair, J., Glass, L., an der Heiden, U., Milton, M., editors. *Dynamical Disease: Mathematical Analysis of Human Illness*. American Institute of Physics Press, USA (Book print of: *Chaos*, 5 (1): 1-7, 1995).
- [3] Benavides M., Lévi F., Reinberg A., Touitou Y. 1992. Alteration of circadian rhythmicity in cancer patients : the role of prognostic factors. *Proc. 5th Int. Conf. Chronopharm.*, Amelia Island, Fl., USA, X-4.
- [4] Bernard-Weil, E. 1985. Lack of reponse to a drug: A system theory approach. *Kybernetes*, 14: 25-30.
- [5] Bernard-Weil, E. 1986. A general model for the simulation of balance, imbalance and control by agonistic-antagonistic couples, *Math. Modelling*, 7: 1587-1600.
- [6] Bernard-Weil, E., Pertuiset, B. 1983. Mathematical model for hormonal therapy (vasopressin, corticoids) in cerebral collapse and malignant tumors of the brain (36 cases); *Neurol. Res.*, 5: 19-35.
- [7] Bertheault-Cvitkovic F., Jami A., Itzhaki M., Deprés-Brummer P., Brienza S., Adam R., Bismuth H., Misset J.M., Lévi F. 1996. Biweekly intensified ambulatory chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14 (11) : 2950-2958.
- [8] Bertheault-Cvitkovic F., Lévi F., Soussan S., Brienza S., Adam R., Itzhaki M., Misset J.L., Bismuth H. 1993. Circadian-rhythm modulated chemotherapy with high-dose 5-fluorouracil : a pilot study in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer*, 29A (13) : 1851-1854.
- [9] Bübbing, E. 1973. The Physiological Clock. Circadian Rhythms and Biological Chronometry. Springer Verlag, 3<sup>rd</sup> revised edition.
- [10] Canon, C., Lévi, F. 1992. Immune System in Relation to Cancer. In: Touitou, Y., Haus, E., editors. *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer Verlag. p. 633-647.
- [11] Caussanel J.P., Lévi F., Brienza S., Misset J.L., Itzhaki M., Adam R., Milano G., Hecquet B., Mathé G. 1990. Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J. Natl Cancer Inst.*, 82 : 1046-1050.

- [12] Claude, D., Nadjar, N. 1994. Nonlinear Adaptive Control of Adrenal-Postpituitary Imbalances and Identifiability Analysis. *Math. Biosciences*, 121: 155-192.
- [13] Claude, D. 1995. Shift of a limit cycle in biology: From pathological to physiological homeostasia. *Chaos*, 5(1): 162-166.
- [14] Claude, D., Clairambault, J., 1999. Period shift induction by intermittent stimulation in a *Drosophila* model of PER protein oscillations. *Chronobiol. Internat.*, to appear.
- [15] Garufi C., Lévi F., Aschelter A.M., Giunta S., Pace R., Nistico C., Tropea F., Cardamone I., Silecchia G.F., Terzoli E. 1997. A Phase I trial of five day chronomodulated infusion of 5-fluorouracil and l-folinic acid in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 33 (10) : 1566-1571.
- [16] Giacchetti S., Brienza S., Focan C., Metouri A., Perpoint B., Faggiuolo R., Llory J.F., Le Rol A., Larregain-Fournier D., Tigaud J.M., Debotte G., Itzhaki M., Misset J.L., Lévi F. 1998. Contribution of second line oxaliplatin (oxa)-chronomodulated 5-fluorouracil - folinic acid (CM-5-FU-FA) and surgery to survival in metastatic colorectal cancer patients (MCC pts). *Proc. 34th Ann. Meeting Am. Soc. Clin. Oncol.*, abstr. 1050.
- [17] Giacchetti S., Itzhaki M., Gruia G., Adam R., Zidani R., Déprés-Brummer P., Bleuzen P., Bertheault-Cvitkovic F., Kunstlinger F., Brienza S., Jasmin C., Alafaci E., Reynes M., Bismuth H., Misset J.L., Lévi F. 1999. Long term survival of patients with unresectable colorectal liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, folinic acid, oxaliplatin and surgery. *Ann. Oncol.*, 10 : 1-7.
- [18] Giacchetti S., Zidani R., Perpoint B., Pinel M.C., Faggiuolo R., Focan C., Letourneau Y., Chollet P., Llory J.F., Coudert B., Bertheault-Cvitkovic F., Adam R., Le Bail N., Misset J.L., Bayssas M., Lévi F. 1997. Phase III trial of 5-fluorouracil (5-FU), folinic acid (FA), with or without oxaliplatin (OXA) in previously untreated patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCC). *Proc. 33rd Annual Meeting Am. Soc. Clin. Oncol.*, Denver, CO, U.S.A., abstr. # 805.
- [19] Goldbeter, A. 1991. Du codage par fréquence des signaux intercellulaires à l'ébauche d'une chronopharmacologie généralisée. *Bulletin et Mémoires de l'Académie de Médecine de Belgique*, 146 : 113-127.
- [20] Goldbeter, A. 1993. Du codage par fréquence des signaux intercellulaires à l'ébauche d'une chronopharmacologie généralisée. *Bulletin du Groupe d'Étude des Rythmes Biologiques*, 25 (n° 7, 1993), p. 131-145.
- [21] Goldbeter, A. 1995. A model for circadian oscillations in the *Drosophila* period protein (PER), *Proc. R. Soc. Lond.*, B, 261: 319-324.
- [22] Goldbeter, A. 1996. Biochemical oscillations and cellular rhythms. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

- [23] Gruia G., Giacchetti S., Deprés P., Jami A., Zidani R., Bleuzen P., Misset J.L., Lévi F. 1996. Role of time of peak delivery of chronomodulated 5-fluorouracil (5-FU), 1-leucovorin (LV) and oxaliplatin (L-OHP) in patients with metastatic colorectal cancer. *Proc. 32nd meeting Am. Soc. Clin. Oncol.*, Philadelphia, PA, U.S.A., vol. 15 : abstr. 372.
- [24] Hartmann, C., Joseph, C., Millet, B. 1998. *Biologie et physiologie de la plante. Âge chronologique, âge physiologique et activités rythmiques.* Nathan, Paris.
- [25] Langouët A.M., Metzger G., Comisso M., Renée N., Milano G., Mormont C., Lévi F. 1996. Plasma drug concentration control through time-programmed administration. *Proc. 87th meeting Am. Ass. Cancer Res.*, Washington D.C., U.S.A., vol. 37, abstr. 1253.
- [26] Langouët A.M., Metzger G., Comisso M., Renée N., Milano G., Mormont M.C., Gruia G., Giacchetti S., Lévi F. 1995. Plasma concentration of 5-fluorouracil and mononuclear cell dihydropyrimidine dehydrogenase activity in patients treated with different chronomodulated schedules. *Proc. World Conference on Chronobiology and Chronotherapeutics*, Ferrara, Italy, *Biol. Rhythm Res.*, 26 (4) : 409 (abstr. 135).
- [27] Leloup, J.-C., Goldbeter, A. 1997. Temperature compensation of circadian rhythms: control of the period in a model for circadian oscillations of the PER protein in *Drosophila*. *Chronobiol. Internat.*, 14(5): 511-520.
- [28] Leloup, J.-C., Goldbeter, A. 1998. A Model for Circadian Rhythms in *Drosophila* Incorporating the Formation of a Complex between the PER and TIM proteins. *J. Biol. Rhythms*, 13(1): 70-87.
- [29] Lévi F., Misset J.L., Brienza S., Adam R., Metzger G., Itzhaki M., Caussanel J.P., Kunstlinger F., Lecouturier S., Descorps-Declère A., Jasmin C., Bismuth H., Reinberg A. 1992. A chronopharmacologic Phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 69 : 893-900.
- [30] Lévi, F., Zidani, R., Misset, J.-L. 1997. Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *The Lancet*, 350(59079): 681-686.
- [31] Lévi, F. 1997. Chronopharmacology of anticancer agents. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.: Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms, Chap. 11: Cancer Chemotherapy (p. 299-331). P.H. Redfern and B. Lemmer, Eds. Springer Verlag.
- [32] Lévi F., Metzger G., Zidani R., Misset J.L. for the International Organization for Cancer Chronotherapy 1997. Chronotherapy with 5-fluorouracil, oxaliplatin, and folinic acid in colorectal cancer. Reply. *Lancet*, 350 : 1325-1326.
- [33] Lévi F., Perpoint B., Garufi C., Focan C., Chollet P., Deprés-Brummer P., Zidani R., Brienza S., Itzhaki M., Iacobelli S., Kunstlinger F., Gastiaburu J., Misset J.L. 1993. Oxaliplatin activity

against metastatic colorectal cancer. A Phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur. J. Cancer*, 29 (9) : 1280-1284.

[34] Lévi F., Zidani R., Brienza S., Dogliotti L., Perpoint B., Rotarski M., Letourneau Y., Llory J F., Chollet P., Le Rol A., Kanoui A., Focan C., Giacchetti S., Bertheault-Cvitkovic F., Kunstlinger F., Adam R., Itzhaki M., Jasmin C. and Misset J L. for the International Organization for Cancer Chronotherapy, 1999. A multicenter evaluation of intensified ambulatory chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as initial treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 85 : 2532-2540.

[35] Lévi F., Zidani R., Vannetzel J.M., Perpoint B., Focan C., Faggiuolo R., Chollet P., Garufi C., Itzhaki M., Dogliotti L., Iacobelli S., Adam R., Kunstlinger F., Gastiaburu J., Bismuth H., Jasmin C., Misset J.L. 1994. Ambulatory chemotherapy of metastatic colorectal cancer with oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid : improved activity and tolerability through chronomodulated delivery in a randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86 : 1608-1617.

[36] Machover D., Diaz-Rubio E., De Gramont A., Schilf A., Gastiaburu J.-J., Brienza S., Itzhaki M., Metzger G., N'Daw D., Vignoud J., Abad A., François E., Gamelin E., Marty M., Sastre J., Seitz J.-F., Ychou M. 1996. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann. Oncol.*, 7 : 95-98.

[37] Metzger G., Massari C., Etienne M.C., Commisso M., Brienza S., Touitou Y., Milano G., Bastian G., Misset J.L., Lévi F. 1994. Spontaneous or imposed circadian changes in plasma concentrations of 5-fluorouracil coadministered with folinic acid and oxaliplatin : relationship with mucosal toxicity in cancer patients. *Clin. Pharm. Ther.*, 56 : 190-201.

[38] Mormont M.C., Bleuzen P., Lellouch J., Misset J.L., Lévi F. 1997. Prognostic value of circadian rhythm assessment for survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Proc. 33rd Annual Meeting Am. Soc. Clin. Oncol.*, Denver, CO, U.S.A., abstr. # 956.

[39] Mormont M.C., Giacchetti S., Waterhouse J., Lellouch J., Misset J.L., Lévi F. 1998. Activity circadian rhythm as an independent prognostic factor of survival in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCC). . *Proc. 34th Ann. Meeting Am. Soc. Clin. Oncol.*, abstr. 1032.

[40] Mormont, M.C., Lévi, F. 1997. Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int. J. Cancer*, 70: 241-247.

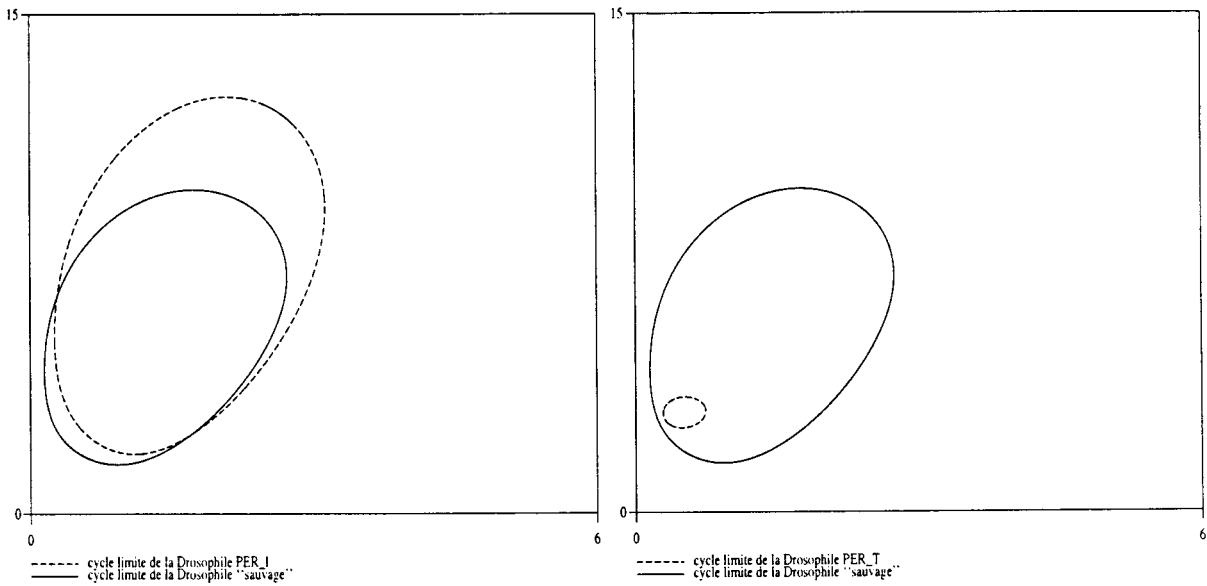
[41] Petit E., Milano G., Lévi F., Thyss A., Bailleul F., Schneider M. 1988. Circadian varying plasma concentration of 5-FU during 5-day continuous venous infusion at constant rate in cancer patients. *Cancer Res.*, 48 : 1676-1679.

[42] Sweeney, B.M. 1969. Rhythmic phenomena in plants. Academic Press.



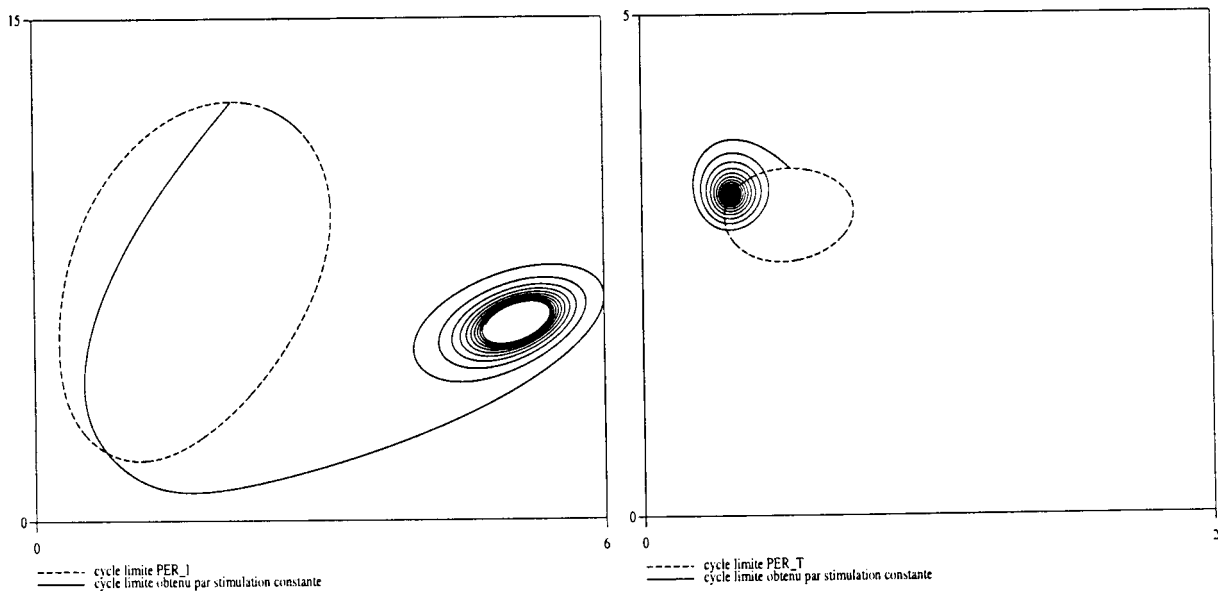
- [43] Touitou Y., Bogdan A., Lévi F., Benavides M., Auzéby A. 1996. Disruption of the circadian patterns of serum cortisol in breast and ovarian cancer patients. Relationships with tumor marker antigens. *Brit. J. Cancer*, 74 : 1248-1252.
- [44] Touitou, Y., Haus, E. (Eds) 1992, 1994. *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer Verlag.
- [45] Touitou Y., Lévi F., Bogdan A., Benavides M., Bailleul F., Misset J.L. 1995. Circadian desynchronisation of blood variables in patients with metastatic breast cancer. Role of prognostic factors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121 : 181-188.
- [46] Vanden Driessche, Th., Guisset, J.-L., Petiau-de Vries, G.M. (Eds) 1996. *Membranes and Circadian Rhythms*. Springer Verlag.
- [47] Winfree, A.T. 1980. *The geometry of biological time*. Springer Verlag.

**Figures 1a et 1b. Cycles limites non contrôlés.**



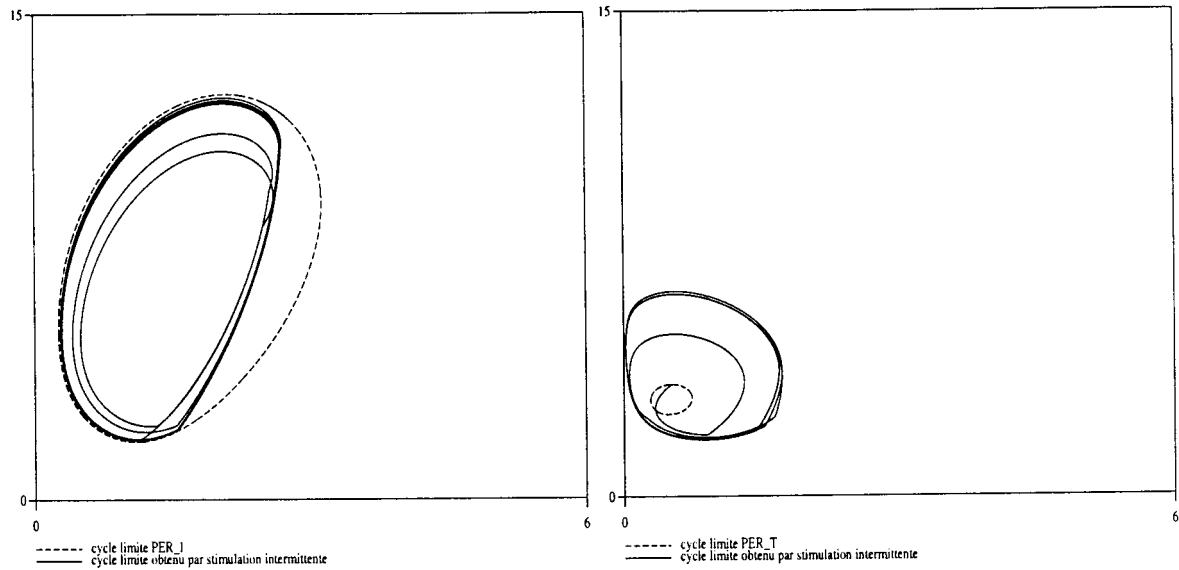
**Figure 1a :** (gauche) le cycle limite de la *Drosophila* mutante *per<sup>l</sup>* comparé au cycle limite de la *Drosophila* sauvage dans le plan  $(M, P_t)$  ; **Figure 1b :** (droite) ditto, pour la mutante *per<sup>T</sup>*.

**Figures 2a et b. Essai de contrôle des cycles limites par perfusion continue.**



**Figure 2a :** (gauche) le cycle limite de la *Drosophila* mutante *per<sup>l</sup>*, contrôlé par une stimulation inhibitrice constante d'amplitude  $-0,5h^{-1}$  dans le plan  $(M, P_t)$  ; **Figure 2b :** (droite) le cycle limite de la mutante *per<sup>T</sup>*, contrôlé par une stimulation activatrice constante d'amplitude  $0,5h^{-1}$  dans le plan  $(M, P_t)$ .

**Figures 3a et 3b.** Contrôle des cycles limites par perfusion périodique intermittente.



**Figure 3a :** (gauche) le cycle limite de la *Drosophile* mutante  $per^l$ , contrôlé par une stimulation intermittente activatrice d'amplitude  $0,4h^{-1}$ , de durée d'exposition 6 h et de condition initiale le creux de  $P_t$ , dans le plan  $(M, P_t)$  ;

**Figure 3b :** (droite) le cycle limite de la mutante  $per^T$ , contrôlé par une stimulation intermittente inhibitrice d'amplitude  $-0,4h^{-1}$ , de durée d'exposition 8 h et de condition initiale le pic de  $P_t$ , dans le plan  $(M, P_t)$ .

Dans les deux cas, un entraînement 1-1 parfait est obtenu et le cycle limite contrôlé a bien une période de 24 heures.