



**HAL**  
open science

# Modélisation de données pharmacologiques précliniques et cliniques d'efficacité des médicaments anti-angiogéniques en cancérologie

Aziz Ouerdani

► **To cite this version:**

Aziz Ouerdani. Modélisation de données pharmacologiques précliniques et cliniques d'efficacité des médicaments anti-angiogéniques en cancérologie. Modélisation et simulation. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAM018 . tel-01496174

**HAL Id: tel-01496174**

**<https://theses.hal.science/tel-01496174>**

Submitted on 27 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mathématiques appliquées**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Aziz OUERDANI**

Thèse dirigée par **Benjamin RIBBA**  
préparée au sein de l'**Inria Grenoble**  
dans l'**École Doctorale MSTII**

# Modélisation de données pharmacologiques précliniques et cliniques d'efficacité des médicaments anti-angiogéniques en cancérologie

Thèse soutenue publiquement le **27 Mai 2016**,  
devant le jury composé de :

**Pr. Paolo MAGNI**

Professeur à l'Université de Pavie, Rapporteur

**Pr. Thierry COLIN**

Professeur à l'Université de Bordeaux, Rapporteur

**Pr. Dominique BARBOLOSI**

Professeur à l'université d'Aix-Marseille, Président

**Dr. Marylore CHENEL**

Directrice de la pharmacocinétique clinique à Servier, Membre

**Dr. Nicolas FREY**

Directeur de la pharmacologie clinique à F. Hoffmann-La Roche, Membre

**Pr Iñaki FERNÁNDEZ TROCÓNIZ**

Professeur à l'Université de Pampelune, Membre

**Dr Benjamin RIBBA**

Chargé de Recherche à Inria Grenoble, Directeur de thèse



*« L'homme modeste n'a ni la honte de ne pas tout savoir, ni la prétention de savoir ce qu'il ignore. »*

Proverbe anglais

*« Souffre pour savoir, et travaille pour avoir. »*

Proverbe français

*« Pour qu'un enfant grandisse, il faut tout un village. »*

Proverbe africain

*A mes chers parents,*

*A Mohcine et Loubna,*

*A mes neveux*



# REMERCIEMENTS

Les trois années de thèse n'auraient jamais été aussi simples sans les personnes qui m'ont entourées, que j'ai rencontrées, ou même simplement côtoyées. A ces personnes je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Je remercie chaleureusement le **Pr. Paolo Magni** d'accepter d'être rapporteur de mes travaux de thèse, et qui plus est en français. C'est une personne que j'ai découverte à DDMoRe, que j'ai pu revoir à bien d'autres événements et pour qui j'ai beaucoup de respect. Merci pour tes cours de pharmacocinétique à ALDO et pour ta bonne humeur. Grazie mille ! Un énorme merci au **Pr. Thierry Colin** d'avoir accepté la délicate mission d'être rapporteur de ma thèse.

**Benjamin Ribba**, je te suis reconnaissant de m'avoir choisi pour faire partie de cette aventure, de m'avoir trimbalé de Grenoble à Nice en passant par Pampelune, Bâle et Paris. Je te remercie pour la patience dont tu as fait preuve à mon égard, pour toutes ces choses que tu m'as apprises, pour tous ces conseils que tu m'as donnés et encore pour les pizzas et les pâtes à l'italienne avec Chiara et les enfants. J'ai passé trois années magnifiques bien que difficiles parfois.

Quiero agradecer y reconocer todo mi respeto y reconocimiento al **Pr. Iñaki Trocóniz**. He descubierto una persona maravillosa, un pedagogo generoso y muy comprometido con sus alumnos. He pasado seis meses fantásticos en Pamplona donde he aprendido mucho a través de sus clases, sus consejos, sus silencios y su experiencia. Muchísimas gracias.

Un énorme merci au **Dr. Marylore Chenel** pour m'avoir soutenu et encouragé. Merci pour ta bienveillance et ton aide. C'était super de te côtoyer à DDMoRe. Merci aussi d'accepter d'être dans ce jury.

Je souhaiterais également remercier le **Dr. Nicolas Frey** pour l'attention qu'il a porté à mes travaux et notamment au temps qu'il m'a accordé lui et son équipe à Roche lors de ma présentation.

Merci au **Pr. Dominique Barbolosi** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Naturellement, je tiens à remercier **l'équipe NUMED** et notamment **Emmanuel Grenier** et **Sylvie Boyer**. Merci pour votre accueil, votre disponibilité, votre aide et tout ce que vous avez pu faire pour rendre ces trois années les plus simples et les plus agréables possibles. Merci aussi à **l'Inria** (et aux personnes concernées) pour nous offrir des conditions de travail idéales, pour leur aide, leur réactivité, leur gentillesse et leur capacité à trouver des solutions aux problèmes que j'ai pu rencontrer.

Je souhaiterais aussi remercier **le projet DDMoRe** pour avoir financé ces travaux de thèse, m'avoir fourni des projets et des collaborations intéressantes, pour m'avoir permis de rencontrer et côtoyer les meilleurs acteurs actuels de la pharmacométrie, ainsi que pour la bonne ambiance générale lors des consortiums. Un merci spécial à **Wendy Aartsen** qui fait un travail fantastique pour nous permettre de nous retrouver à Amsterdam dans des conditions optimales.

Je ne peux parler pas d'Iñaki sans parler de son équipe et des gens que j'ai rencontrés à Pampelune : **María, María-Jesús, José-David, Jacky, Laurent, Leire, Itziar, Yolanda, Nacho, Ana Margarita** et **Melissa**. Merci pour votre accueil, pour les soirées tapas, Dixit et San Fermin, pour les cafés de 11h, votre bonne humeur communicative et votre gentillesse. Une pensée spéciale à **Núria**, pour m'avoir tant appris, rassuré et accompagné durant mes six mois. Tu auras été un modèle de réussite pour moi et tu m'auras inspiré et poussé vers le haut, merci infiniment.

Chère **Pauline**, merci pour ton écoute, tes conseils, pour les rigolades et surtout les meringues, confiture de lait et brownie au chocolat dont j'étais le meilleur des cobayes. Mais un grand merci pour ton soutien indéfectible, pour ton aide sur ce manuscrit et ton aide en général. J'espère que nous aurons l'occasion de nous retrouver peu importe les routes que nous aurons prises.

Après Núria et Pauline, vient naturellement **Shelby** ! Tu auras égayé ma première année de thèse avec tes phrases cultes, ton super mug des US et ton expérience.

Enfin je souhaiterais remercier les personnes qui m'ont ouvert la voie ou m'ont motivé à me lancer en pharmacométrie.

Merci à **Salim** de m'avoir encouragé et accompagné depuis ma 3<sup>ème</sup> année de pharmacie. Merci pour tes conseils, merci de m'avoir poussé à faire un stage à Buffalo. Merci à **Anne-Gaëlle** et **Emilie** d'avoir été des exemples pour moi, de me motiver et de m'avoir aidé à trouver une thèse. Merci à **Benjamin** pour les rigolades au PAGE et pour ton aide pour R, tu es un vrai geek ma parole !

Merci à mes frères d'armes du master PK, **Adrien, Elodie, Thierry** et **Justine**. C'est cool de vous suivre et vous revoir en conférence ou aux différentes soutenances des uns et des autres.

Une pensée à **Floris, Simon** et **Mailys**, c'est toujours un plaisir de vous revoir et discuter avec vous.

Je souhaite remercier toutes ces personnes avec qui j'ai travaillées durant ces trois années : celles du projet **DDMoRe**, de **l'université d'Uppsala**, mes collaborateurs de **GSK (Herbert, Daniele et Ben)**, du **service de Neurochirurgie de la Pitié-Salpêtrière (Dr. Kalamarides et Dr. Goutagny)**, de **la clinique universitaire de Navarre à Pampelune, l'équipe Asclépios** à Sophia-Antipolis (**Thomas, Clair, Nina, Hakim, Mehdi, Rocio** et tous les autres) et **le département de Clin Pharm de Roche** à Bâle.

Pour finir je voudrais dire merci à ma famille. Merci à **ma mère** pour s'être battue afin qu'on puisse réussir. Merci à **Mohcine** et **Loubna** pour vos heures de galère au magasin, sans quoi j'aurais vraiment ramé pour faire mes études. Et puis le meilleur pour la fin, merci à **mon père** d'avoir été un modèle de gentillesse, de sérieux et de travailleur acharné. Tout ce qui commence ici est pour vous car vous l'avez mérité et que cette réussite, si réussite il y a, est en grande partie la vôtre.

# RESUME

## **Modélisation de données pharmacologiques précliniques et cliniques d'efficacité des médicaments anti-angiogéniques en cancérologie**

En l'espace d'une quarantaine d'années, les connaissances sur l'angiogenèse tumorale ont littéralement explosé. Dans les années 1970, Judah Folkman démontre que les tumeurs ont besoin d'être vascularisées pour continuer à proliférer. Peu de temps après, les protagonistes principaux de l'angiogenèse tumorale ont été découverts, de même que les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués. La décennie suivante marque le début des recherches sur les molécules à visée anti-angiogénique et c'est en 2004 que le bevacizumab (Avastin, Roche), premier médicament anti-angiogénique utilisé en oncologie, voit le jour. Parallèlement à cela, l'essor de la modélisation à effets-mixtes couplé aux progrès des outils informatiques ont permis de développer des méthodes d'analyses de données de plus en plus performantes. Dès 2009 l'agence de régulation FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis a identifié le rôle central de la modélisation numérique pour mieux analyser les données d'efficacité et de toxicité, préclinique et clinique en cancérologie. Le but de ce projet est d'étudier les effets de différents inhibiteurs de l'angiogenèse sur la dynamique tumorale, en se basant sur une approche populationnelle. Les modèles développés seront des modèles à base d'équations différentielles ordinaires intégrant des données et des informations issues de la littérature. L'objectif de ces modèles est de caractériser la dynamique des tailles tumorales chez les animaux et chez les patients, afin de comprendre les effets des traitements anti-angiogéniques et apporter un soutien pour le développement de ces molécules ou pour la prise de décisions thérapeutiques par les cliniciens.



# ABSTRACT

## **Modeling of preclinical and clinical pharmacological data for the efficacy of antiangiogenic compounds in oncology**

Within the last 40 years, knowledge of tumor angiogenesis has literally exploded. In the seventies, Judah Folkman demonstrated that tumors need to be vascularized to continue to proliferate. Shortly after, the main protagonists of tumor angiogenesis have been discovered, as well as the mechanisms in which they are involved. The next decade is the beginning of the research on molecules with anti-angiogenic effects and in 2004 bevacizumab (Avastin, Roche), the first antiangiogenic drug used in oncology, was available for treating solid cancer patients. Along with this, the increasing interest of mixed-effects modeling coupled with advances in computer tools allowed developing more efficient methods of data analysis. In 2009, the regulatory agency FDA (Food and Drug Administration) in the United States has identified the central role of numerical modeling to better analyze the efficacy and toxicity preclinical and clinical oncology data. The aim of this project is to study the effects of different angiogenesis inhibitors on tumor dynamics, based on a population approach. The developed models are models based on ordinary differential equations and that integrate data and information from the literature. The objective of these models is to characterize the dynamics of tumor sizes in animals and patients in order to understand the effects of anti-angiogenic treatments and provide support for the development of these molecules, or to help clinicians for therapeutic decision making.

# LISTE DES PUBLICATIONS

## **Preclinical Modeling of Tumor Growth and Angiogenesis Inhibition to Describe Pazopanib Clinical Effects in Renal Cell Carcinoma.**

Aziz OUERDANI, Herbert Struemper, Ben A. Suttle, Daniele Ouellet, Benjamin Ribba.

CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. (2015) 4, 660–668; doi:10.1002/psp4.12001

Contribution : Analyse des données, mise en place et participation au travail de recherche et écriture de l'article.

## **Mechanism-Based Modeling of the Effects of Bevacizumab and Everolimus for the treatment of Vestibular Schwannoma in patients with Neurofibromatosis Type 2.**

Aziz OUERDANI, Stéphane Goutagny, Michel Kalamarides, Iñaki F. Troconiz.

Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2016), 1-11; doi:10.1007/s00280-016-3046-2

Contribution : Analyse des données, mise en place et participation au travail de recherche et écriture de l'article.

## **Modeling and Predicting Optimal Treatment Scheduling Between the Antiangiogenic Drug Sunitinib and Irinotecan in Preclinical Settings.**

Shelby Wilson, Michel Tod, Aziz OUERDANI *et al.*

CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. (2015) 4, 720–727; doi:10.1002/psp4.12045

Contribution : Participation au travail de recherche.

# LISTE DES COMMUNICATIONS

## Communications affichées:

- Aziz Ouerdani, Stéphane Goutagny, Michel Kalamarides, Iñaki F. Trocóniz  
*Effects of bevacizumab and everolimus for the treatment of vestibular schwannoma on patients with neurofibromatosis type 2*
  - PAGE 2015, Hersonissos, Crete  
<http://www.page-meeting.org/default.asp?abstract=3457>
  - GMP 2015, Paris, France
- Aziz Ouerdani, Herbert Struemper, Ben Suttle, Daniele Ouellet, Benjamin Ribba  
*Tumor growth and angiogenesis inhibition modeling: effects of pazopanib on preclinical and clinical tumor size data*
  - PAGE 2014, Alicante, Spain  
<http://www.page-meeting.org/default.asp?abstract=3126>
  - GMP 2014, Paris, France

## Communications orales:

- Aziz Ouerdani, Stéphane Goutagny, Michel Kalamarides, Iñaki F. Trocóniz  
*Effects of bevacizumab and everolimus for the treatment of vestibular schwannoma on patients with neurofibromatosis type 2*
  - GMP 2015, Paris, France
- Aziz Ouerdani, Herbert Struemper, Ben Suttle, Daniele Ouellet, Benjamin Ribba  
*Tumor growth and angiogenesis inhibition modeling: effects of pazopanib on preclinical and clinical tumor size data*
  - DDMoRe Consortium Meeting 2014, Paris, France

# PRIX

## Prix du meilleur poster de la conférence GMP 2015 :

- Aziz Ouerdani, Stéphane Goutagny, Michel Kalamarides, Iñaki F. Trocóniz

*Effects of bevacizumab and everolimus for the treatment of vestibular schwannoma on patients with neurofibromatosis type 2*

# INDEX DES FIGURES

Figure 1.1. Principe de l'angiogenèse tumorale.....	24
Figure 1.2. Rôle de l'hypoxie comme facteur déclenchant de l'angiogenèse.....	25
Figure 1.3. Sites d'actions des anti-angiogéniques. ....	29
Figure 1.4. Evolution du réseau vasculaire tumoral sous thérapie anti-angiogénique.....	30
Figure 1.5. Représentation schématique de la relation entre pharmacocinétique et pharmacodynamique. ....	32
Figure 1.6. Organigramme des principaux phénomènes élémentaires dans un modèle pharmacocinétique .....	34
Figure 1.7. Modèle "Target-Mediated Drug Disposition" général .....	37
Figure 1.8. Allures de l'effet pharmacologique en fonction de la concentration de médicament. ...	42
Figure 1.9. Courbe des concentrations et effets en fonction du temps .....	43
Figure 1.10. Influence des paramètres $E_{MAX}$ , $EC_{50}$ et $\gamma$ sur la relation concentration/effet.....	45
Figure 1.11. Evolution de la taille tumorale selon un modèle logistique généralisé avec capacité de charge fixe ou évolutive. ....	59
Figure 1.12. Représentation schématique du modèle d'interaction entre le sunitinib et l'irinotécan. ....	65
Figure 1.13. Courbes d'ajustement entre les simulations (lignes) et les observations (points). ....	68
Figure 1.14. Nadir du diamètre tumoral moyen chez des souris traitées par sunitinib pendant 12 jours en fonction de différents temps d'administration d'irinotécan.....	70
Figure 2.1. Angiogenèse du carcinome à cellules rénales. ....	118
Figure 2.2. Dynamiques tumorales individuelles pour 4 groupes de 8 souris : un groupe contrôle et trois groupes recevant du pazopanib à 10, 30 ou 100 mg/kg/jour. ....	119
Figure 2.3. Principales dynamiques tumorales pour une sélection de 16 patients traités par pazopanib issus d'un essai clinique de phase II. ....	120
Figure 2.4. Ajustement entre les observations et les simulations individuelles issues de quatre modèles différents pour trois souris de chaque groupe. ....	124

Figure 2.5. Dynamiques tumorales pouvant être obtenues grâce à la fonction logistique généralisée avec capacité de charge évolutive.....	126
Figure 2.6. Ajustement entre les observations et les simulations individuelles issues de trois effets différents du pazopanib dans un modèle logistique généralisé avec capacité de charge évolutive pour trois souris de chaque groupe.....	128
Figure 2.7. Graphiques diagnostics du modèle final pour l'analyse des données précliniques. ....	131
Figure 2.8. Ajustement entre les observations et les simulations individuelles issues de trois modèles pour un sous-groupe arbitraire de neuf patients. ....	132
Figure 2.9. Graphiques diagnostics du modèle final pour l'analyse des données cliniques. ....	134
Figure 2.10. Influence de la capacité de charge initiale sur le profil tumoral.....	138
Figure 3.1. a. Schéma de l'oreille interne et de la localisation du SV. b. Nerfs craniens et leurs points d'ancrages au niveau du tronc cérébral. ....	180
Figure 3.2. Evolution de la taille tumorale en $\text{cm}^3$ en fonction du temps en années pour 22 patients. ....	182
Figure 3.3. Représentation schématique du modèle "target-mediated drug disposition" quasi-stationnaire tel que décrit dans Panoilla et al. 2015 .....	188
Figure 3.4. Représentation schématique des différentes interactions possible entre le complexe mTORC1 et ses cibles potentielles (VEGF et/ou tumeur).....	190
Figure 3.5. Représentation schématique des différentes interactions possible entre le signal final des compartiments de transit et la tumeur.. ....	191
Figure 3.6. Représentation schématique des différentes interactions possibles entre le VEGF et la tumeur. ....	192
Figure 3.7. Graphiques diagnostics du modèle final. ....	195
Figure 3.8. Prédiction de la dynamique tumorale individuelle pour des patients dont les données tronquées sont utilisées comme données externes pour évaluer la qualité des prédictions. ....	197
Figure A.1. Illustration du principe de fonctionnement d'un système d'EDO grâce à l'exemple du remplissage d'une baignoire. ....	210
Figure A.2. Principe de l'analyse de population. ....	212
Figure A.3. Principe de l'algorithme "Stochastic Approximation Expectation Maximization" .....	222
Figure A.4. Construction des "Visual Predictive Check" .....	233

# INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Equations et schémas des principaux modèles utilisés en pharmacocinétique.....	36
Tableau 1.2. Equations et schéma d'un modèle extravasculaire avec un compartiment d'effet .....	46
Tableau 1.3. Equations, schémas et profils attendus des quatre modèles à effet indirect. ....	50
Tableau 1.4. Equations et profils attendus pour la fonction linéaire, exponentielle, biphasique et logistique générale.....	52
Tableau 2.1. Résultats du critère BIC pour le "screening" de modèles sur les données précliniques. .....	130
Tableau 2.2. Résultats du critère BIC pour le screening de modèles sur les données cliniques. ....	133
Tableau 2.3. Valeurs finales des paramètres estimés par approche de population.....	135
Tableau 3.1. Comparaison des scores Bayésiens (BIC) pour différents modèles de croissance tumorale. ....	185
Tableau 3.2. Valeurs des paramètres estimés du modèle pour les dynamiques tumorales sans traitement.....	186
Tableau A.1. Valeurs significatives du test du rapport de vraisemblance en fonction du nombre de paramètres supplémentaires $p$ et du risque $\alpha$ . ....	227
Tableau A.2. Graphiques diagnostiques usuels. ....	230

# Abréviations

5-FU	5-FluoroUracile
AIC	Akaike Information Criterion
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APC	Angle Ponto-Cérébelleux
ATP	Adénosine Triphosphate
AUC	Area Under Curve
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BIC	Bayesian Information Criterion
c-KIT	Stem cell factor receptor
CWRES	Conditional WRES
D	Dépôt
EDO	Equation Différentielle Ordinaire
EM	Expectation-Maximization
EMA	European Medicines Agency
EV	Extravasculaire
FO	First Order
FOCE	First Order Conditional Estimate
FOLFIRI	Acide Folinique, 5-FU, Irinotécan
fVEGF	free VEGF
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$
IIV	Inter-Individual Variability
IPRED	Individual predictions
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
IV	Intravasculaire



LL	Log-Likelihood
MAP	Maximum A Posteriori
MCMC	Monte-Carlo Markov Chain
MLE	Maximum Likelihood Estimate
MM TMDD	Michaelis-Menten TMDD
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC	mammalian Target Of Rapamycin Complex
NF2	Neurofibromatose de type 2
NONMEM	Nonlinear Mixed-Effects Modeling
OBS	Observations
pcVPC	Prediction-corrected VPC
PD	Pharmacodynamique
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PK	Pharmacocinétique
PIGF	Placental Growth Factor
PRED	Population predictions
QE TMDD	Quasi Equilibrium TMDD
QSS TMDD	Quasi Steady-State TMDD
RES	Residuals
RSE	Residual Standard Error
SAEM	Stochastic Approximation of Expectation-Maximization
SV	Schwannomes Vestibulaires
TAF	Tumor Angiogenesis Factor
TMDD	Target Mediated Drug Disposition
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL	Von Hippel Lindau
VPC	Visual Predictive Check
WRES	Weighted residuals

# TABLE DES MATIERES

PRÉFACE .....	20
INTRODUCTION GENERALE .....	21
I- ANGIOGENESE TUMORALE ET ANTI-ANGIOGENIQUES .....	22
A. L'angiogenèse tumorale .....	22
B. Les anti-angiogéniques .....	26
II- LA PHARMACOMETRIE EN ONCOLOGIE .....	31
A. Généralités .....	31
B. Modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique.....	32
C. Application à l'étude des propriétés pharmacocinétiques-pharmacodynamiques des médicaments anticancéreux.....	51
III- LES TRAVAUX DE THÈSE .....	63
IV- Modélisation et prédiction préclinique d'un régime de dose optimal entre le sunitinib et l'irinotécan .....	64
A. Le modèle d'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse avec interaction entre le sunitinib et l'irinotécan.....	64
B. Résultats.....	68
C. Conclusion .....	71
V- REFERENCES.....	72
MODELISATION DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE TUMORALE ET DE L'ANGIOGENESE POUR DECRIRE LES EFFETS CLINIQUES DU PAZOPANIB DANS LE TRAITEMENT DU CARCINOME RENAL.....	80
I- PUBLICATION .....	81
II- Complément d'article .....	117
A. Contexte général .....	117
B. Objectifs .....	122
C. Démarche de construction du modèle.....	123
D. Résultats .....	136
E. Discussion et impact sur le développement clinique du pazopanib .....	137
F. Limites du modèle .....	139
G. Références .....	141
MODELISATION SEMI-MECANISTIQUE DES EFFETS CLINIQUES DU BEVACIZUMAB ET DE L'EVEROLIMUS SUR LES SCHWANNOMES VESTIBULAIRES DE PATIENTS ATTEINTS DE NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 2 .....	143
I- PUBLICATION.....	144

II- Complément d'article .....	179
A. Contexte général .....	179
B. Objectifs .....	183
C. Démarche de construction du modèle mécanistique.....	184
D. Résultats .....	193
E. Discussion .....	199
F. Références .....	199
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	202
ANNEXE .....	207
I- Principe des équations différentielles ordinaires.....	209
II- L'APPROCHE DE POPULATION .....	212
A. Généralités .....	212
B. Méthodes d'estimation paramétrique .....	217
C. Evaluation des modèles .....	225
III- PUBLICATION WILSON ET AL. 2015 .....	235
IV- REFERENCES .....	244
GLOSSAIRE .....	246

# PRÉFACE

Le type de cette thèse est dit "thèse sur article" ou "thèse sur travaux". Après une introduction générale présentant les connaissances générales nécessaires à la bonne compréhension de ses travaux, nous affichons dans les chapitres suivants les articles que j'ai écrits en tant que premier auteur.

Cependant, j'ai jugé plus intéressant qu'en plus des articles, je décrive la démarche personnelle et scientifique que j'ai adoptée pendant mes projets. C'est une partie qui permet d'approfondir un peu plus les articles qui sont parfois trop synthétiques. Dans chaque complément d'article :

- J'explique le contexte général du projet et les objectifs principaux.
- Je décris brièvement les données en portant l'accent sur des informations qui m'ont guidé dans mon travail de recherche.
- Je détaille la démarche que j'ai suivie pour analyser les données et atteindre mes objectifs.
- Enfin je présente et discute les résultats essentiels.

De plus, le lecteur trouvera dans ce manuscrit des mots qui sont à la fois soulignés et en italique. Cela signifie qu'une définition est disponible dans le glossaire en fin de manuscrit. C'est une façon de rendre ces travaux de thèse accessible au plus grand nombre en expliquant des termes qui peuvent être trop techniques ou trop spécialisés.

# CHAPITRE 1

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

# I- ANGIOGENESE TUMORALE ET ANTI-ANGIOGENIQUES

## A. L'angiogenèse tumorale

### 1. Judah Folkman et les origines de l'angiogenèse tumorale

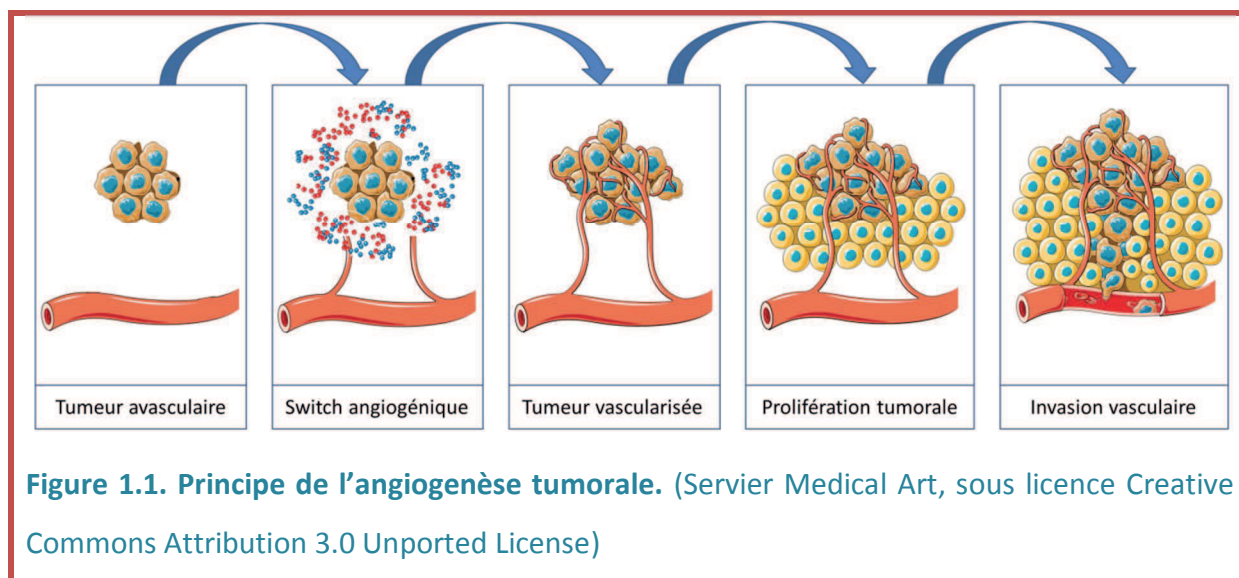
Le terme angiogenèse provient des mots grecs *angeion* et *genesis* qui signifient respectivement "vaisseau" et "naissance". Par définition, l'angiogenèse correspond au processus par lequel se développent de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. C'est un phénomène physiologique qui joue un rôle lors notamment du développement embryonnaire, des menstruations ou encore de la cicatrisation tissulaire. En oncologie, l'angiogenèse joue un rôle fondamental dans la croissance tumorale et la formation des métastases. Le chercheur et médecin Judah Folkman est le pionnier de la recherche sur l'angiogenèse tumorale [1]. En 1963, il remarque lors de ses études *in vitro* que des tumeurs isolées dans des organes perfusés ne croissent pas au-delà de 2 mm de diamètre et ne se vascularisent jamais [2]. Il émet l'hypothèse que pour se développer et proliférer, les tumeurs ont besoin d'un apport d'oxygène et de nutriments plus important que celui apporté par simple diffusion passive ; autrement dit, elles doivent être vascularisées. En 1971, il isole avec son équipe ce qu'il appelle le "tumor angiogenesis factor" ou TAF ; une protéine soluble présente dans les cellules tumorales et qui est capable de provoquer une angiogenèse [3]. Cette même année, il suggère l'inhibition de ce processus d'angiogenèse tumorale comme nouvelle cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement des cancers [4]. Les nombreuses études menées au sein de son équipe les années

suivantes lui permettent de confirmer ses hypothèses sur les mécanismes de l'angiogenèse tumorale [5–7]. C'est à partir des années 1980 que le Dr. Folkman et ses collègues vont commencer à s'intéresser à des inhibiteurs de l'angiogenèse. Ils découvrent des propriétés anti-angiogéniques à l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$  [8], au facteur plaquettaire IV [9], à l'angiostatine [10], l'endostatine [11], le thalidomide [12] et bien d'autres encore [13, 14]. 35 ans plus tard, la thérapie anti-angiogénique occupe une place importante dans l'arsenal thérapeutique pour le traitement des tumeurs.

## 2. L'angiogenèse tumorale

Depuis les travaux de Folkman, les principaux mécanismes et protagonistes de l'angiogenèse ont été identifiés. Nous savons désormais que l'angiogenèse est une étape indispensable au développement tumoral. En deçà de 2 mm de diamètre, les tumeurs sont alimentées par diffusion passive et sont avasculaires (figure 1.1). Pour continuer à proliférer, les cellules tumorales vont synthétiser des facteurs pro-angiogéniques qui vont stimuler le développement d'un réseau vasculaire au sein de la tumeur : c'est ce que l'on appelle le "switch angiogénique" [15]. L'apport supplémentaire de nutriments et d'oxygène va permettre à la tumeur de proliférer et à long terme, de se disséminer dans l'organisme pour former des métastases (figure 1.1).

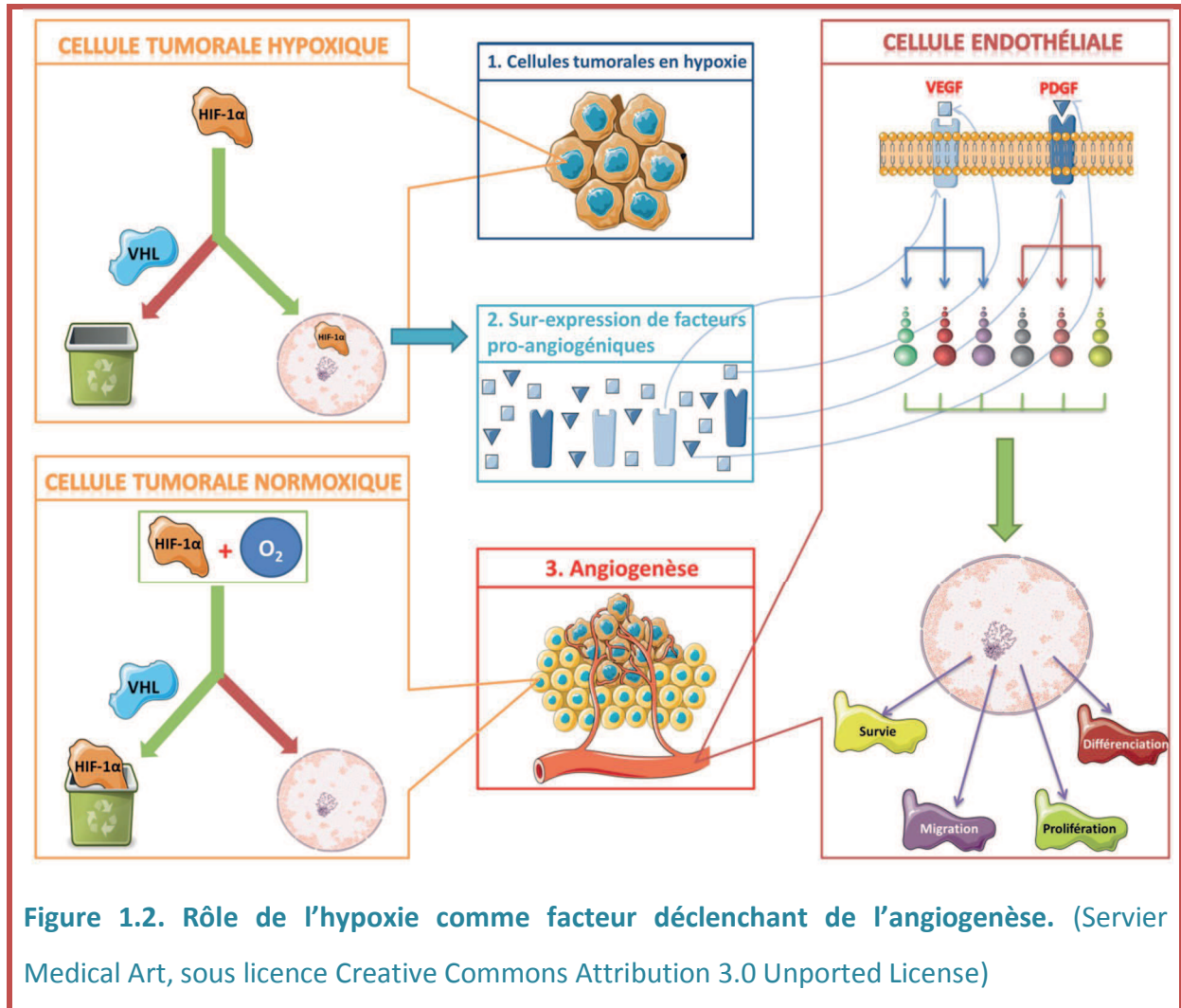




La découverte du TAF par Judah Folkman en 1971 a ouvert la voie à l'étude des facteurs pro-angiogéniques. Les travaux de Dvorak, Senger et Ferrara dans les années 1980 ont abouti à la découverte du "vascular endothelial growth factor" ou VEGF ; le facteur pro-angiogénique par excellence [16–18] (voir résumé de [19]). On sait aujourd'hui qu'il n'existe pas un mais une multitude de facteurs pro-angiogéniques responsables de la formation de néo-vaisseaux tumoraux. Les plus importants sont le VEGF, le "basic fibroblast growth factor" (bFGF) ou encore le "platelet derived growth factor" (PDGF) pour ne citer qu'eux. Dans les conditions physiologiques, ces facteurs sont régulés de façon rigoureuse et sont en parfait équilibre avec leurs antagonistes anti-angiogéniques.

L'*hypoxie*, qui correspond à une baisse de la quantité d'oxygène, est un puissant stimulant de l'*angiogénèse*. Lorsque les cellules sont en *hypoxie*, la protéine "hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ " (HIF-1 $\alpha$ ) ne peut pas être hydroxylée et se retrouve dans le noyau (figure 1.2). Dans celui-ci, elle va pouvoir activer la synthèse de protéines pro-angiogéniques, comme le VEGF ou le PDGF par exemple, qui vont aller se fixer sur leurs récepteurs au niveau des cellules endothéliales. S'en suivra l'activation de diverses cascades de

signalisation dont la conséquence finale sera la synthèse de protéines stimulant la prolifération, la différenciation, la migration et la survie des cellules endothéliales constituant les vaisseaux préexistants (figure 1.2).



De nouveaux capillaires vont se développer en direction des cellules hypoxiques afin d'apporter les nutriments et l'oxygène indispensables à leur survie. Chez ces cellules tumorales en *normoxie*, la protéine HIF-1 $\alpha$  va pouvoir être hydroxylée ; elle sera reconnue par la protéine Von Hippel Lindau (VHL) qui l'adressera au *protéasome*, un complexe enzymatique qui détruit les protéines qui lui sont fournies [20]. En étant détruite, HIF-1 $\alpha$  ne

va plus pouvoir activer la synthèse de facteurs pro-angiogéniques, c'est la fin de la stimulation de l'angiogenèse par la cellule.

## B. Les anti-angiogéniques

De par son rôle central dans l'angiogenèse, le VEGF ainsi que ses récepteurs se situent au premier rang des cibles d'intérêts thérapeutiques. Il existe aujourd'hui une douzaine de molécules anti-angiogéniques réparties en trois catégories principales. Il y a les traitements qui vont cibler directement le VEGF, ceux qui vont inhiber la transduction du signal au niveau des récepteurs membranaires et enfin, des molécules qui vont agir plus en aval de la cascade de signalisation.

### 1. Le VEGF comme cible principale

Le principe de ces traitements est d'empêcher le VEGF de se fixer sur ses récepteurs en le ciblant directement. Par conséquent, le VEGF ne peut activer la voie de signalisation menant à la création de nouveaux capillaires sanguins.

Le bevacizumab est un pionnier de la thérapie anti-angiogénique. Il s'agit du tout premier anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF. C'est aussi le premier traitement à visée anti-angiogénique à avoir obtenu en 2004 une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement du cancer colorectal métastatique en association avec du 5-FluoroUracile (5-FU) [21].

L'aflibercept est une protéine de fusion produite à partir des fragments extracellulaires des récepteurs 1 et 2 du VEGF (VEGFR-1 et 2). Par conséquent l'aflibercept

présente l'avantage de cibler les types A et B du VEGF mais aussi la protéine "placental growth factor" ou PlGF [22]. Le composé a été approuvé pour le traitement en seconde ligne du cancer colorectal métastatique en association avec une polychimiothérapie FOLFIRI (acide folinique, 5-FU, irinotécan) pour des tumeurs résistantes ou ayant progressé après un traitement à base d'oxaliplatine [23].

## **2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase comme cibles principales**

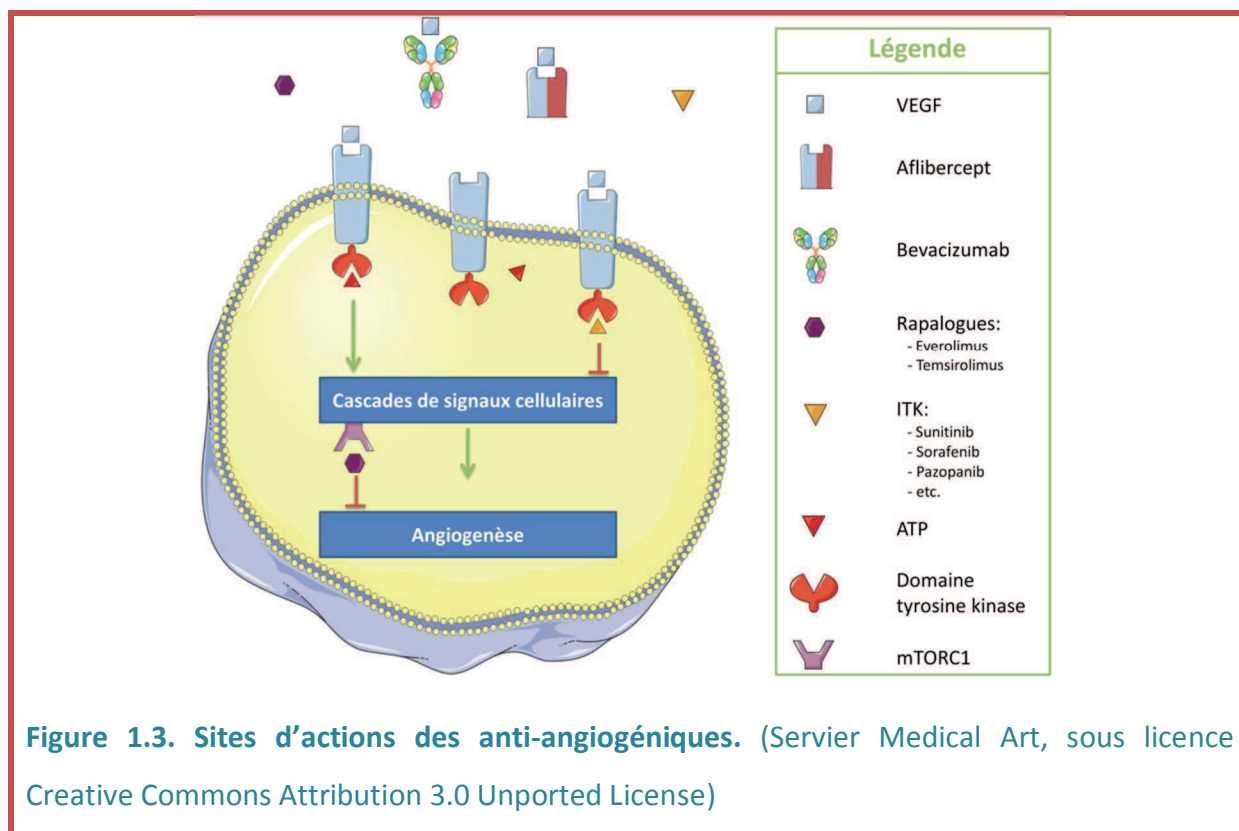
Les facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou le PDGF se fixent sur le domaine extracellulaire de leurs récepteurs. Cela a pour effet d'activer l'ancrage de l'ATP sur les domaines tyrosine-kinase de la partie intracellulaire du récepteur. La phosphorylation des résidus tyrosine est le point de départ de l'activation d'une série de kinases dont la finalité est d'induire l'angiogenèse. Les inhibiteurs de tyrosine-kinase (ITK) sont de petites molécules qui vont pouvoir traverser la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales et se fixer sur les résidus tyrosine à la place de l'ATP. Ainsi, ils vont mimer l'ATP sans toutefois pouvoir activer la transduction du signal.

Ces dernières années, ces ITK ont connu un essor considérable de par leurs avantages [24]. En effet, ils sont administrés par voie orale, contrairement au bevacizumab ou à l'aflibercept, et peuvent agir simultanément sur différents récepteurs. Parmi les plus utilisés nous pouvons citer le sunitinib, le sorafenib ou l'imatinib. De nombreuses nouvelles molécules ont obtenu l'AMM peu de temps après comme le pazopanib ou l'axitinib et d'autres encore sont en développement clinique. La majorité d'entre elles ciblent un ou plusieurs récepteurs du VEGF, certaines vont en plus viser ceux du PDGF, du FGF et bien d'autres encore.

### 3. La protéine "mammalian target of rapamycin" comme cible principale

La dernière catégorie de l'arsenal thérapeutique anti-angiogénique concerne des molécules qui vont inhiber la cible de la rapamycine chez les mammifères ou mTOR. Cet effecteur se situe en aval de la voie de signalisation, bien après la fixation du VEGF sur son récepteur et la phosphorylation des résidus tyrosine. mTOR est une sérine-thréonine kinase qui va phosphoryler, et donc activer divers substrats jouant un rôle dans la synthèse protéique, l'autophagie, la prolifération, le métabolisme et la survie cellulaire. Parmi ces substrats on retrouve la protéine HIF-1 $\alpha$  dont nous avons précédemment décrit les effets sur l'angiogenèse. mTOR agit sous forme de complexe (mTORC1 et mTORC2) en s'associant à d'autres protéines [25].

Les molécules dirigées contre mTOR sont des analogues de la rapamycine ou rapalogues. Les deux principaux rapalogues utilisés en oncologie sont le temsirolimus et l'everolimus. Ils agissent uniquement sur le complexe mTORC1 et inhibent ses effets néoplasiques et angiogéniques [26, 27].

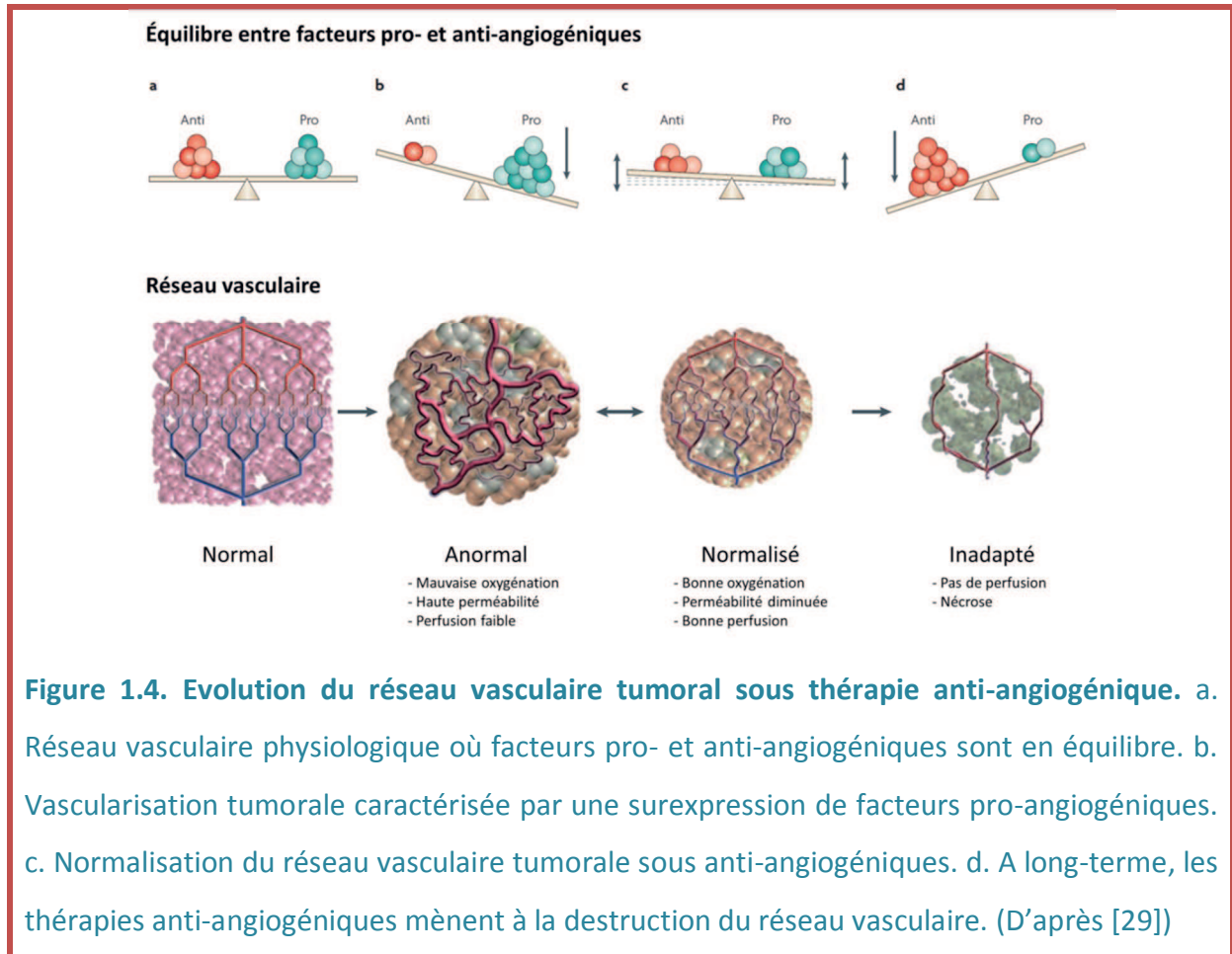


La figure 1.3 récapitule l'ensemble des cibles des traitements anti-angiogéniques.

#### 4. Effets des anti-angiogéniques sur la vascularisation tumorale

Le but des composés anti-angiogéniques est d'empêcher la formation de nouveaux vaisseaux et de détruire le réseau vasculaire tumoral. En privant la tumeur de ses ressources principales, les cellules finissent par se nécroser. Le réseau vasculaire d'une tumeur est complètement anarchique. C'est la conséquence directe d'un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques qui sont prédominants, et les facteurs anti-angiogéniques. Selon plusieurs évidences scientifiques, les inhibiteurs de *l'angiogenèse* vont dans un premier temps rétablir l'équilibre entre les entités pro- et anti-angiogéniques, et aboutir à une normalisation du réseau vasculaire tumoral. Ce phénomène va permettre à la tumeur d'être

mieux perfusée, ce qui va améliorer la distribution des médicaments au sein de la tumeur [28].



Ceci peut expliquer pourquoi les combinaisons d'agents cytotoxiques et anti-angiogéniques sont parfois si efficaces. D'ailleurs les composés énumérés précédemment sont souvent utilisés en combinaison avec des agents cytotoxiques. Après une inhibition à long-terme de l'*angiogenèse*, les cellules tumorales se nécrosent, la tumeur synthétise moins de facteurs pro-angiogéniques, ce qui favorise la prédominance des facteurs anti-angiogéniques apportés par le traitement. Ce nouveau déséquilibre mène à la destruction du réseau vasculaire et à la réduction de la taille tumorale.

## II- LA PHARMACOMETRIE EN ONCOLOGIE

### A. Généralités

La pharmacométrie est une science pluridisciplinaire récente qui s'intéresse à la quantification des effets pharmacologiques du médicament. On entend par pharmacologie la science des interactions entre le médicament et l'organisme.

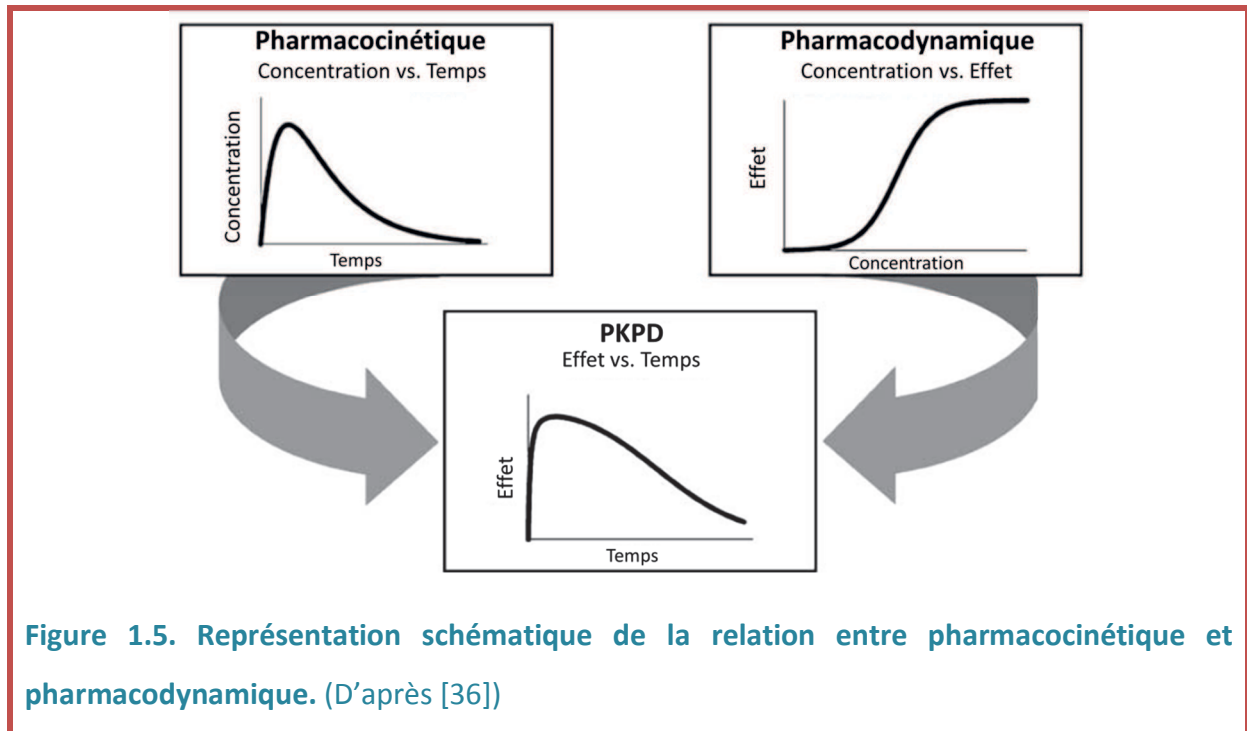
Les effets que le corps humain exerce sur le médicament sont étudiés par la pharmacocinétique (PK). Cette discipline s'intéresse en particulier aux processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion du médicament par l'organisme [30]. Elle permet de caractériser l'évolution de la concentration du médicament en fonction du temps.

A l'inverse, les effets que va produire le médicament sur le corps humain sont expliqués par la pharmacodynamique (PD). Celle-ci se penche sur l'évolution d'une réponse biologique en fonction de la quantité de médicament (dose, concentration ou exposition). La combinaison de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique (PKPD) permet de décrire l'évolution d'un effet biologique en fonction du temps (figure 1.5).

Les applications de la pharmacométrie sont extrêmement nombreuses. Premièrement, elle joue un rôle descriptif en permettant notamment d'analyser le comportement PKPD d'un médicament [31] ou d'un biomarker [32], de quantifier et de comprendre les différences entre individus [33], d'étudier les interactions de plusieurs



traitements [34] ou encore d'aider à comprendre le mécanisme d'action d'une molécule [35].



De plus, elle joue un rôle prédictif en rendant possible l'optimisation de protocoles thérapeutiques [37], ou la prédiction de l'efficacité d'un traitement [38, 39]. Par conséquent, grâce à cette liste non exhaustive d'applications, la *pharmacométrie* joue un rôle majeur dans le développement des médicaments.

## B. Modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique

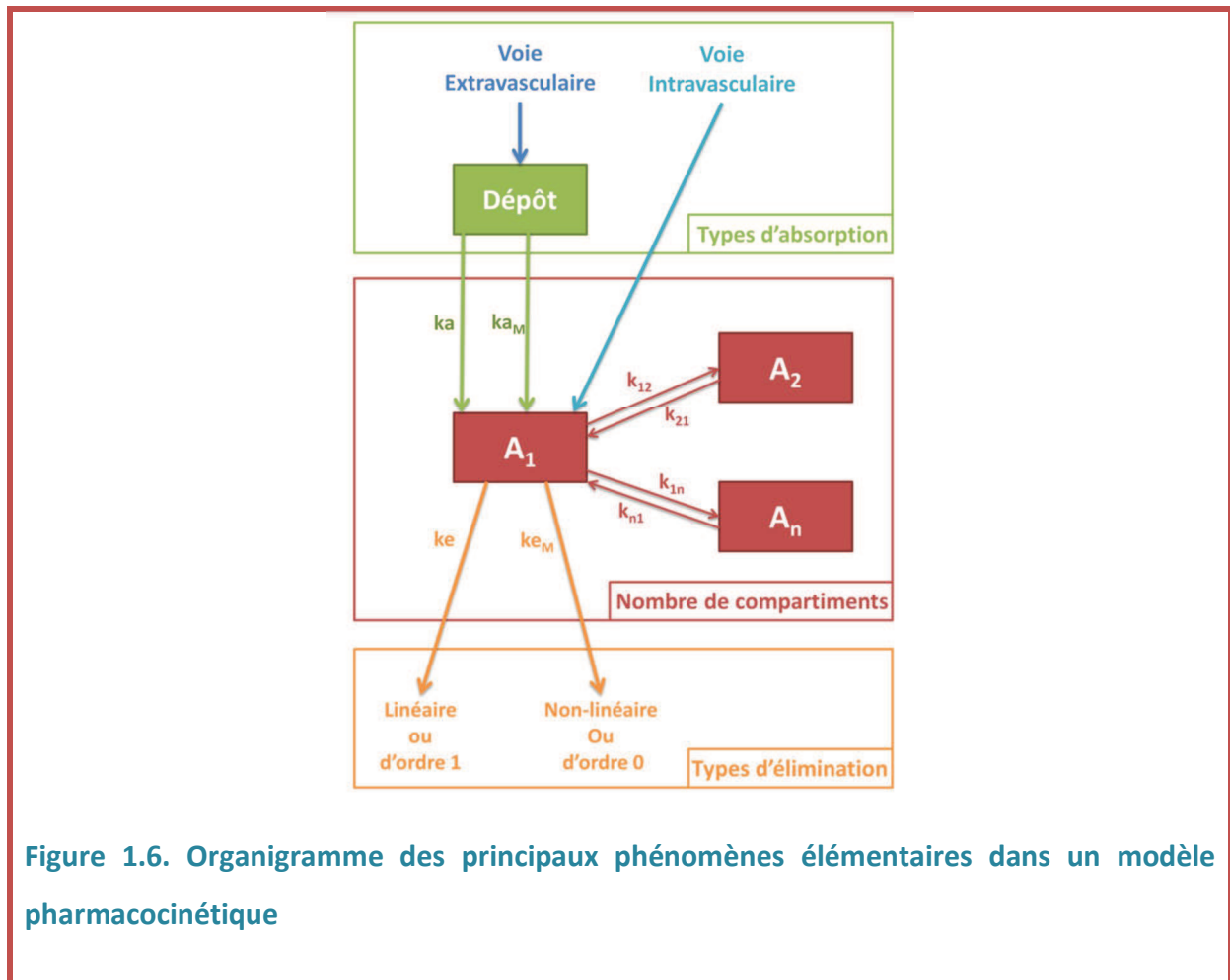
En *pharmacométrie*, la PK et la PD sont étudiées d'un point de vue mathématique et statistique, et portent sur l'utilisation de *modèles* non-linéaires à effets mixtes que l'on appelle aussi approche de population (voir annexe). Un *modèle* correspond à la représentation mathématique d'un phénomène biologique. Dans le contexte de nos travaux, le but d'un *modèle* est de reproduire la dynamique d'un phénomène observé.

## 1. Modélisation pharmacocinétique

### a. La pharmacocinétique classique

En principe, la modélisation PK repose sur l'utilisation de compartiments. Un compartiment est un espace virtuel dans lequel le médicament va se distribuer de façon instantanée et homogène. Les compartiments sont représentés par des systèmes d'équations différentielles ordinaires (EDO) qui décrivent la variation d'une variable en fonction du temps.

L'organigramme présenté figure 1.6 présente les principaux éléments entrant dans la composition d'un modèle PK. Lors d'une administration extravasculaire (EV) (e.g. voie orale, intramusculaire, cutanée, etc.) le médicament se retrouve dans ce que l'on appelle un compartiment de dépôt ( $D$ ). Depuis ce dépôt, la molécule va pouvoir atteindre le compartiment central ( $A_1$ ) de façon linéaire ou non-linéaire. Ainsi,  $k_a$  et  $k_{aM}$  sont respectivement les constantes de vitesse d'absorption linéaire et non-linéaire. Lors d'une administration intravasculaire (IV), le médicament se retrouve directement dans le compartiment central  $A_1$  sans passer par le compartiment de dépôt. En PK, le compartiment central est assimilé à la circulation systémique ainsi qu'aux organes fortement perfusés comme le foie ou les reins. Depuis le compartiment central, le médicament peut se distribuer dans un ou plusieurs compartiments périphériques qui représentent en général des tissus moins facilement accessibles. Dans la figure 1.6,  $A_2$  et  $A_n$  correspondent aux compartiments périphériques.



$k_{12}$  est la micro-constante de transfert du compartiment  $A_2$  vers le compartiment  $A_1$  et vice-versa pour  $k_{21}$ . Toutes les micro-constantes de transfert sont exprimées en [temps<sup>-1</sup>]. Enfin, l'élimination du médicament se fait généralement depuis le compartiment central  $A_1$ , de façon linéaire ou non-linéaire. De même,  $k_e$  et  $k_{eM}$  sont respectivement les constantes de vitesse d'élimination linéaire et non-linéaire. Le tableau 1.1 illustre les principaux modèles PK qui sont utilisés pour décrire la cinétique du médicament en fonction du temps.

Modèle	Equation	Schéma
<b>Modèles à 1 compartiment</b>		
<p><b>I</b></p> <p>Voie IV avec élimination linéaire</p>	$\frac{dA_1}{dt} = -k_e \cdot A_1$ $A_1(t = 0) = Dose$	
<p><b>II</b></p> <p>Voie EV avec élimination linéaire</p>	$\frac{dD}{dt} = -k_a \cdot D$ $\frac{dA_1}{dt} = k_a \cdot D - k_e \cdot A_1$ $D(t = 0) = Dose$ $A_1(t = 0) = 0$	
<b>Modèles à 2 compartiments</b>		
<p><b>III</b></p> <p>Voie IV avec élimination linéaire</p>	$\frac{dA_1}{dt} = k_{21} \cdot A_2 - A_1 \cdot (k_e + k_{12})$ $\frac{dA_2}{dt} = k_{12} \cdot A_1 - k_{21} \cdot A_2$ $A_1(t = 0) = Dose$ $A_2(t = 0) = 0$	

	$\frac{dD}{dt} = -k_a \cdot D$	
	$\frac{dA_1}{dt} = k_a \cdot D + k_{21} \cdot A_2 - A_1 \cdot (k_e + k_{12})$	
<b>IV</b>		
Voie EV avec	$\frac{dA_2}{dt} = k_{12} \cdot A_1 - k_{21} \cdot A_2$	
élimination linéaire	$D(t = 0) = Dose$	
	$A_1(t = 0) = 0$	
	$A_2(t = 0) = 0$	
<b>Tableau 1.1. Equations et schémas des principaux modèles utilisés en pharmacocinétique</b>		

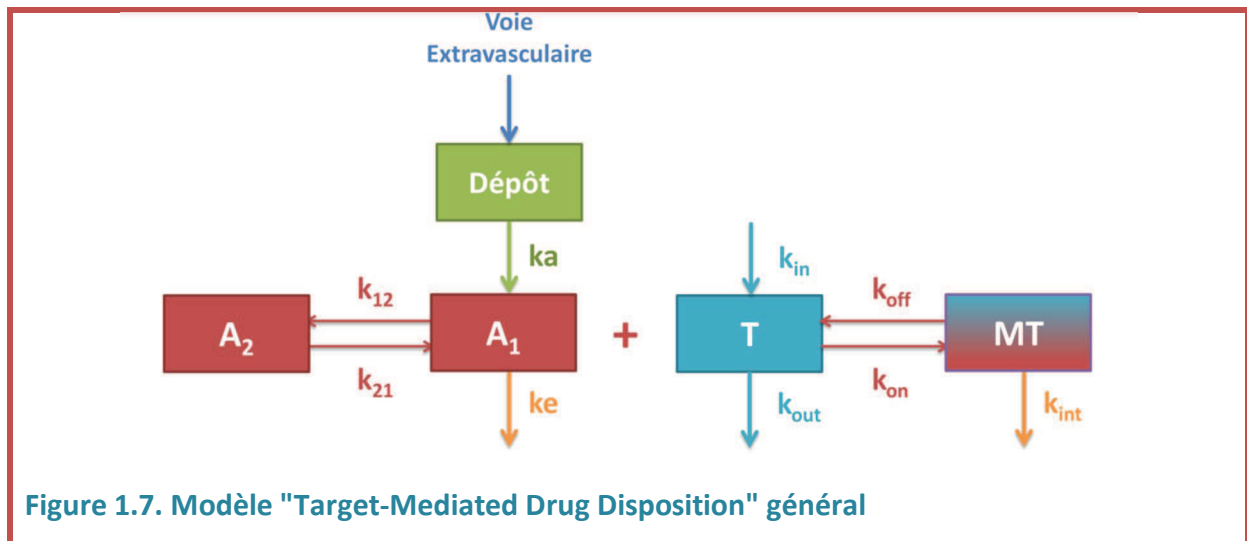
Lorsque le processus d'absorption ou d'élimination est non-linéaire, les schémas et les équations restent les mêmes à la différence près que  $ka$  et  $ke$  sont remplacées par  $ka_M$  et  $ke_M$ . La fonction de Michaelis-Menten est très souvent utilisée pour caractériser un processus non-linéaire (équation 1).

$$ka_M \text{ ou } ke_M = \frac{V_{max}}{K_M + A_1} \quad (1)$$

$V_{max}$  en [quantité/temps] est la vitesse maximale d'absorption ou d'élimination du médicament et  $K_M$  en [quantité], connue comme la constante de Michaelis-Menten, est la quantité de médicament pour laquelle la vitesse du processus est à 50% de  $V_{max}$ . Si un modèle comprend à la fois une absorption et une élimination non-linéaire,  $ka_M$  et  $ke_M$  posséderont chacun leur propre  $V_{max}$  et  $K_M$ .

### b. Modèles "target-mediated drug disposition" et ses approximations

En 1994, Gerhard Levy décrit ce qu'il appelle la "Target-Mediated Drug Disposition" (TMDD), phénomène selon lequel la PK d'agents biologiques possédant une haute affinité pour leur cible se modifie au fur et à mesure que le médicament se lie à sa cible [40]. Il remarque que des paramètres PK, comme le volume de distribution et la clairance, diminuent lorsque la dose administrée augmente. En 2001, Mager et Jusko développent le modèle TMDD [41] qui permet de décrire la PK de médicaments pour lesquels ce phénomène est observé (figure 1.7).



La partie à gauche du signe "+" est un modèle PK classique à deux compartiments avec absorption et élimination linéaire. La quantité de médicament libre  $A_1$  présente dans le compartiment central va pouvoir se lier à sa cible  $T$ , selon une vitesse d'association caractérisée par la constante  $k_{on}$ , pour former un complexe médicament/cible  $MT$ . Ce complexe peut se séparer ou être internalisé et dégradé ;  $k_{off}$  et  $k_{int}$  représentant respectivement les constantes de dissociation et de dégradation du complexe  $MT$ . Enfin, la cible  $T$  est continuellement synthétisée et dégradée ;  $k_{in}$  et  $k_{out}$  étant les constantes de vitesse de synthèse et de dégradation de la cible. Avec ce modèle, on suppose qu'une

molécule de médicament va se lier à une molécule de cible. De plus la liaison entre l'agent biologique et sa cible ne se fait que dans le compartiment central qui comprend donc la quantité de médicament sous forme libre ( $A_1$ ) et sous forme de complexe ( $MT$ ), et la cible elle aussi sous forme libre ( $T$ ) ou en complexe ( $MT$ ). Les équations 2 à 6 représentent la formulation mathématique du modèle TMDD général.

$$\frac{dD}{dt} = -k_a \cdot D \quad (2)$$

$$D(t = 0) = Dose$$

L'équation 2 décrit l'évolution de la quantité de médicament dans le compartiment de dépôt ( $D$ ). Au temps initial, c'est-à-dire lorsque l'on administre le médicament, cette quantité  $D$  est égale à la dose administrée.

$$\frac{dA_1}{dt} = k_a \cdot \frac{D}{V} - A_1 \cdot (k_e + k_{12}) - k_{on} \cdot A_1 \cdot T + k_{off} \cdot MT + k_{21} \cdot \frac{A_2}{V} \quad (3)$$

$$A_1(t = 0) = 0$$

L'équation 3 décrit la dynamique de la concentration de médicament libre ( $A_1$ ) présent dans le compartiment central de volume  $V$ . Cette concentration est égale à zéro dans les conditions initiales puisque le médicament se trouve uniquement dans le compartiment de dépôt.

$$\frac{dA_2}{dt} = k_{12} \cdot A_1 \cdot V - k_{21} \cdot A_2 \quad (4)$$

$$A_2(t = 0) = 0$$

L'équation 4 modélise la quantité de médicament ( $A_2$ ) qui se distribue dans le compartiment périphérique. Cette quantité est nulle avant l'administration du médicament.

$$\frac{dT}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot T - k_{on} \cdot A_1 \cdot T + k_{off} \cdot MT \quad (5)$$

$$T(t = 0) = T_0 = \frac{k_{in}}{k_{out}}$$

L'équation 5 modélise la concentration de la cible ( $T$ ) qui se distribue dans le compartiment central. Cette concentration est à un niveau basal  $T_0$  dans les conditions initiales et qui correspond au rapport des constantes de synthèse  $k_{in}$ , et de dégradation  $k_{out}$  de la cible.

$$\frac{dMT}{dt} = k_{on} \cdot A_1 \cdot T - (k_{int} + k_{off}) \cdot MT \quad (6)$$

$$MT(t = 0) = 0$$

Enfin, l'équation 6 décrit la dynamique de la concentration du complexe médicament/cible ( $MT$ ). Cette concentration est nulle avant l'administration du médicament puisqu'il n'est pas encore présent dans le compartiment central.

Au total, ce modèle comprend un nombre conséquent de 10 paramètres ( $k_a, k_{12}, k_{21}, k_e, V, k_{in}, k_{out}, k_{on}, k_{off}, k_{int}$ ). Pour réduire le nombre de paramètres du modèle TMDD général, des simplifications ont été développées comme l'approximation "Quasi Equilibrium" (QE TMDD) proposée par Mager et Krzyzanski en 2005 [42] et les approximations "Quasi Steady-State" (QSS TMDD) et "Michaelis-Menten" (MM TMDD) développées par Gibiansky et collègues trois ans plus tard [43].

Dans le QE TMDD, on suppose que le médicament libre, la cible libre et le complexe médicament/cible sont en quasi-équilibre. Le processus de formation et séparation du complexe  $MT$ , qui est extrêmement rapide par rapport aux autres processus (absorption et élimination du médicament, dégradation de la cible et l'internalisation du complexe), ne



dépend plus des constantes  $k_{on}$  et  $k_{off}$  mais d'une nouvelle constante  $k_D$  dite constante de dissociation et qui est égale à :  $k_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ .

En ce qui concerne le QSS TMDD, les fractions libres du médicament et de la cible ainsi que le complexe médicament/cible sont en état quasi-stationnaire. A la différence de l'état de QE, la vitesse d'internalisation est aussi rapide que la vitesse de formation/séparation du complexe  $MT$ . La formation, séparation et internalisation du complexe est si rapide que sa concentration semble être constante et très inférieure comparée à celles des substrats. Par conséquent, le processus de formation du complexe  $MT$  ne dépend plus des constantes  $k_{on}$  et  $k_{off}$  mais d'une nouvelle constante  $k_{SS}$  dite constante d'état stationnaire et qui est égale à :

$k_{SS} = \frac{k_{off} + k_{int}}{k_{on}}$ . Ce modèle est particulièrement adapté lorsque les concentrations totales de

médicament et de la cible (incluant les formes libre et complexe) sont disponibles et pour des molécules dont la formation, la dissociation et l'internalisation du complexe est rapide.

Les équations 7 à 13 décrivent le modèle QE TMDD dans le cas où  $k_x$  est égal à  $k_D$ , et le modèle QSS TMDD lorsque  $k_x$  correspond à  $k_{SS}$ . Contrairement au modèle TMDD général (équations 2 à 6),  $A_1$  correspond à la concentration totale de médicament présent dans le compartiment central (forme libre ET complexe),  $A$  est la concentration de médicament sous forme libre,  $T_{tot}$  est la concentration totale de cible dans le compartiment central (forme libre ET complexe) et  $T$  la concentration de cible sous forme libre.

$$\frac{dD}{dt} = -k_a \cdot D \quad (7)$$

$$D(t = 0) = Dose$$

$$\frac{dA_1}{dt} = k_a \cdot \frac{D}{V} - A \cdot (k_e + k_{12}) - \frac{T_{tot} \cdot k_{int} \cdot A}{k_X + A} + k_{21} \cdot \frac{A_2}{V} \quad (8)$$

$$A_1(t = 0) = 0$$

$$\frac{dA_2}{dt} = k_{12} \cdot A_1 \cdot V - k_{21} \cdot A_2 \quad (9)$$

$$A_2(t = 0) = 0$$

$$\frac{dT_{tot}}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot T_{tot} - (k_{int} - k_{deg}) \frac{T_{tot} \cdot A}{k_X + A} \quad (10)$$

$$T(t = 0) = T_0 = \frac{k_{in}}{k_{out}}$$

$$MT = \frac{T_{tot} \cdot A}{k_X + A} \quad (11)$$

$$A = \frac{1}{2} \cdot \left[ (A_1 - T_{tot} - k_X) + \sqrt{(A_1 - T_{tot} - k_X)^2 + 4 \cdot k_X \cdot A_1} \right] \quad (12)$$

$$T = T_{tot} - MT \quad (13)$$

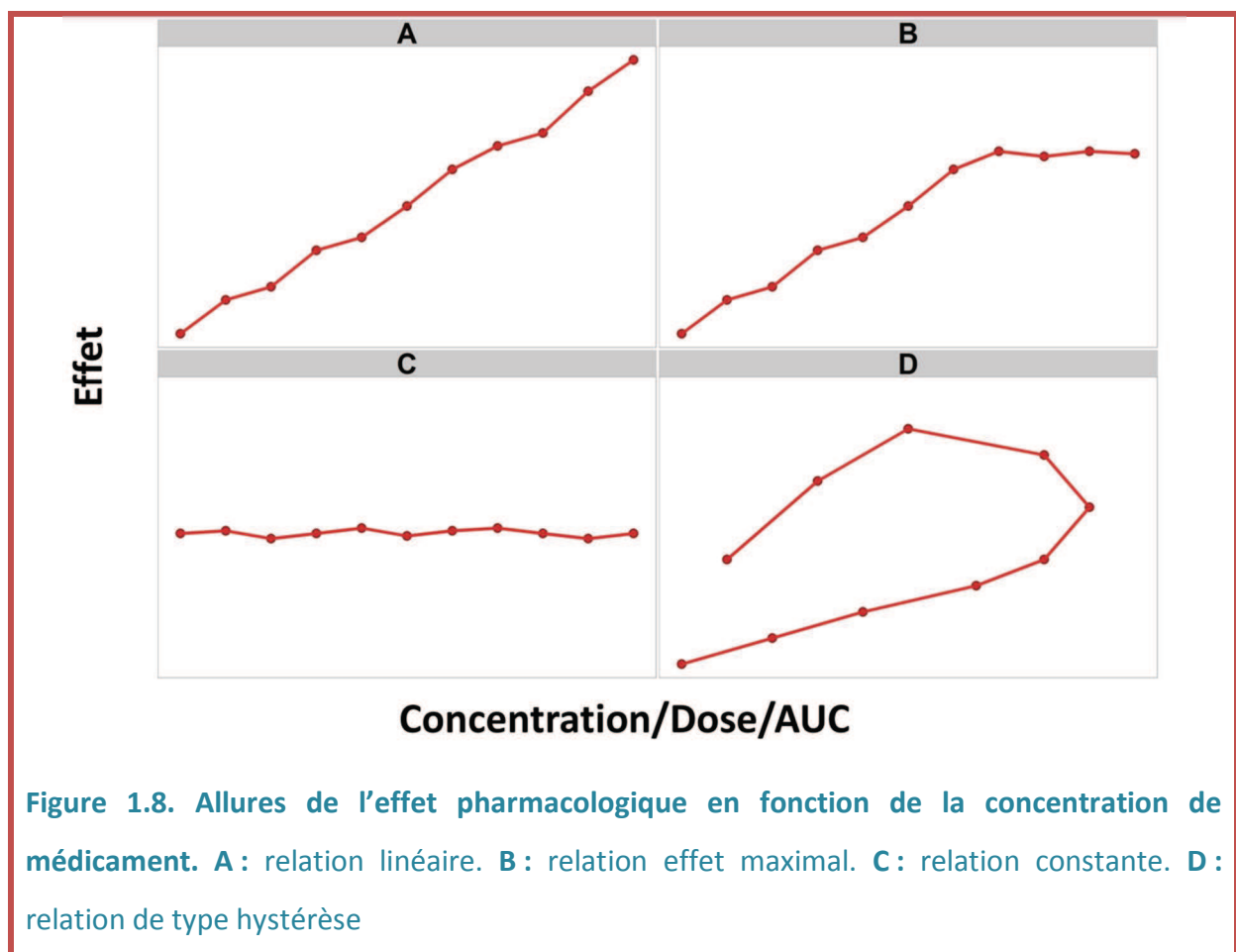
Nous ne détaillerons pas le modèle MM TMDD mais il est intéressant de savoir qu'il est plutôt adapté pour des systèmes où la concentration de la cible est nettement inférieure à celle de la forme libre du médicament. Cette différence de concentration provoque la

saturation de la cible par le médicament, d'où l'intérêt de l'utilisation de la fonction de Michaelis-Menten pour décrire le processus de formation du complexe  $MT$  [43].

## 2. Modélisation pharmacodynamique

### a. Les relations concentration/effet

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la *pharmacodynamique* étudie la relation qui existe entre la quantité de médicament (e.g. dose, concentration ou aire sous la courbe de la concentration en fonction du temps (AUC)) et la réponse pharmacologique. La figure 1.8 illustre les principales relations concentration/effet que l'on peut être amené à rencontrer.



La première relation (figure 1.8.A) est une relation linéaire où la réponse pharmacologique augmente proportionnellement à la concentration du médicament.

Le panneau B de la figure 1.8 illustre le profil d'une relation non-linéaire. Dans un premier temps l'effet augmente avec la concentration avant de se stabiliser à un effet maximal. Toute augmentation de la concentration de médicament n'améliorera plus l'effet du traitement.

Dans le panneau C, la réponse pharmacologique ne dépend pas de la concentration, elle reste constante.

Les profils A et C de la figure 1.8 peuvent être confondus avec le début ou la fin du profil B dans le cas où l'on ne disposerait pas du suivi total de la cinétique.

Le dernier profil (figure 1.8.D) possède une allure très particulière. C'est ce que l'on appelle une hystérèse. Ce type de profil est observé lorsqu'il existe un décalage entre la concentration du médicament et l'effet pharmacologique en fonction du temps.

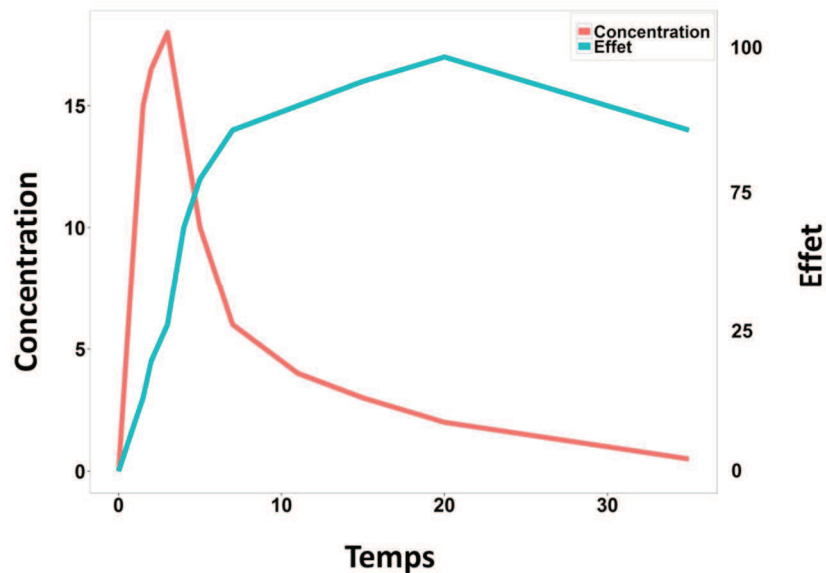


Figure 1.9. Courbe des concentrations et effets en fonction du temps

Comme on peut le voir sur la figure 1.9, le pic de concentration maximal ne coïncide pas avec celui de l'effet maximal. Ainsi, l'effet maximal est observé lorsque les concentrations plasmatiques ont baissé, ce qui explique pourquoi la relation effet/concentration adopte cette forme de boucle. Plus la boucle est large et plus le décalage entre le pic de concentration et le pic d'effet est important.

### *b. Les modèles pharmacodynamiques*

Divers modèles PD permettent de relier la concentration du médicament à son effet.

Les plus basiques sont le modèle linéaire (équation 14) et log-linéaire (équation 15).

$$E = E_0 + \alpha \cdot C \quad (14)$$

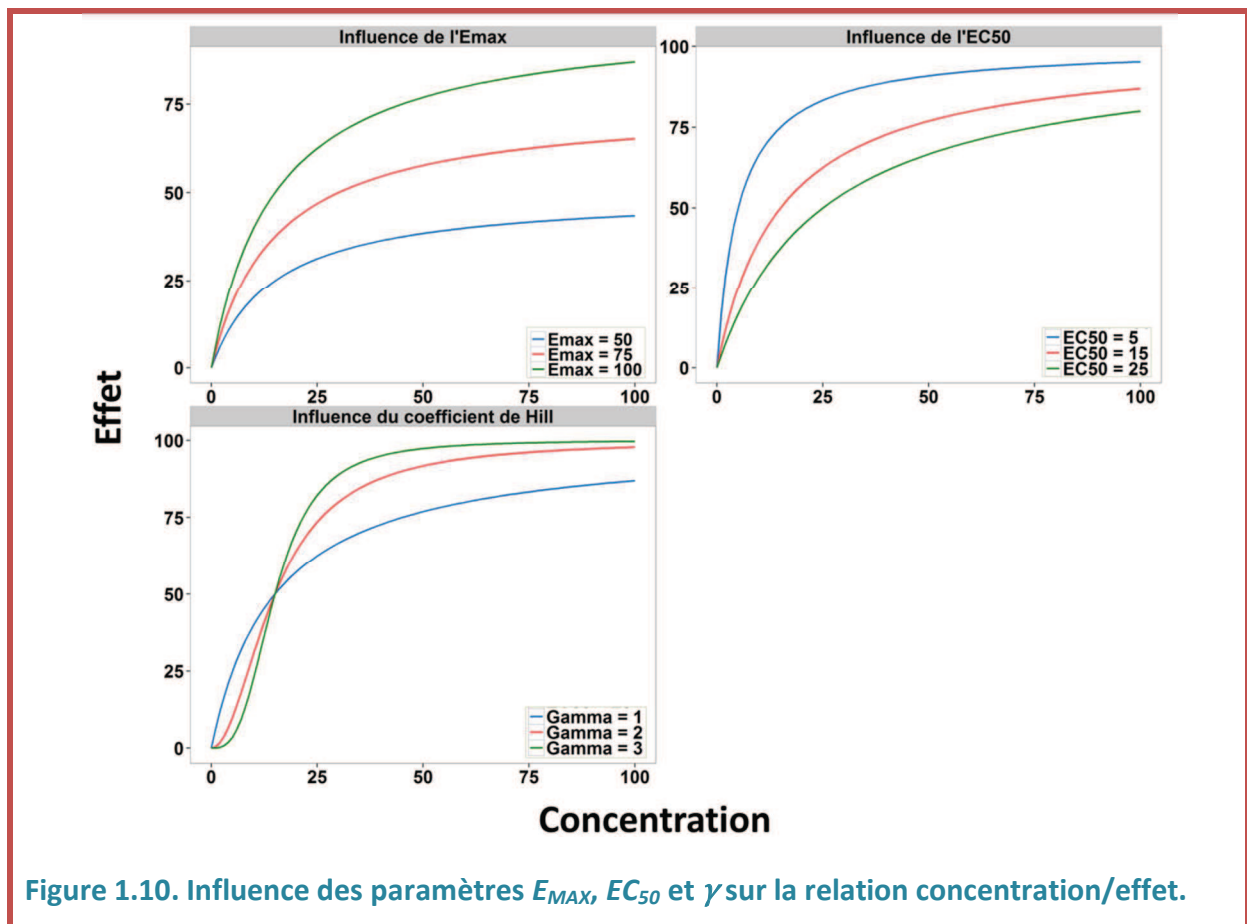
$$E = E_0 + \alpha \cdot \log(C) \quad (15)$$

$E$  est l'effet du traitement,  $E_0$  le niveau basal de l'effet avant traitement,  $\alpha$  la pente de la fonction et  $C$  la concentration plasmatique du médicament. Ces fonctions permettent de décrire des profils linéaires tels que celui présenté dans la figure 1.8.A. Cependant, ce type de modèle sous-entend qu'il n'y a jamais de saturation de l'effet pour de fortes concentrations, ce qui est très peu probable en réalité.

Le modèle avec effet maximum sigmoïdal ou modèle  $E_{MAX}$  sigmoïdal est très utilisé puisqu'il permet de capturer l'effet maximum d'un traitement et de quantifier la puissance et l'efficacité d'une molécule (équation 16).

$$E = E_0 + \frac{E_{MAX} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (16)$$

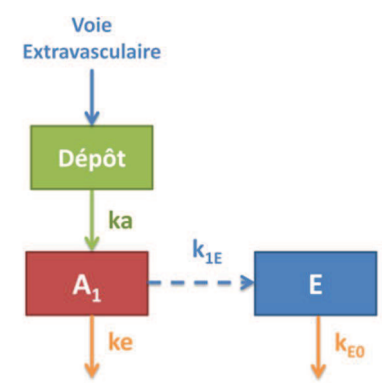
$E_{MAX}$  représente l'effet maximal pouvant être atteint sous traitement. Ce paramètre est compris entre 0% (aucun effet) et 100% (effet maximal) et donne une idée de l'efficacité de la molécule.  $EC_{50}$  ou "Concentration Efficace 50", correspond à la concentration de médicament nécessaire pour atteindre 50% de l'effet maximal. Il représente la puissance de la molécule. Plus l' $EC_{50}$  est petite et plus la molécule est puissante puisqu'une faible quantité est nécessaire pour atteindre 50% de l' $E_{MAX}$ .  $\gamma$  est la constante de sigmoïdité ou constante de Hill. C'est un paramètre qui permet de moduler la relation effet/concentration pour un  $E_{MAX}$  et une  $EC_{50}$  donnés : plus la constante de Hill est basse, plus l'effet sera progressif en fonction de la concentration.



La figure 1.10 montre l'influence des paramètres  $E_{MAX}$ ,  $EC_{50}$  et  $\gamma$  sur la relation concentration/effet.

Néanmoins, l'utilisation de tels modèles nécessite qu'il n'y ait pas de décalage entre la cinétique de la concentration et de l'effet. C'est ce que l'on appelle un effet direct, la concentration du médicament et la réponse pharmacologique évoluent de façon simultanée. Or dans bien des cas, un décalage temporel entre la cinétique de la concentration et celle des effets est observé (figures 1.8.D et 1.9). D'autres modèles PD prenant en compte le délai d'action du médicament ont été développés. Ils permettent de décrire des relations concentration/effet de type hystérèse (figure 1.8.D).

En 1979, Lewis Sheiner développe le modèle PK à compartiment d'effet [44] (tableau 1.2).

Modèle	Equation	Schema
Voie EV à un compartiment PK avec élimination linéaire et compartiment d'effet	$\frac{dD}{dt} = -k_a \cdot D$ $\frac{dA_1}{dt} = k_a \cdot D - k_e \cdot A_1$ $\frac{dE}{dt} = k_{1E} \cdot A_1 - k_{E0} \cdot E$ $D(t=0) = Dose$ $A_1(t=0) = 0$ $E(t=0) = 0$	
<b>Tableau 1.2. Equations et schéma d'un modèle extravasculaire avec un compartiment d'effet</b>		

$E$  correspond à la quantité de médicament présent dans le compartiment d'effet,  $k_{1E}$  [temps<sup>-1</sup>] est la constante de "transfert" vers le compartiment d'effet et  $k_{E0}$  [temps<sup>-1</sup>] la constante

d'élimination du médicament depuis le compartiment d'effet. Ce dernier représente le site d'action du médicament ou biophase. Pour simplifier l'équation, on suppose que  $k_{1E}$  et  $k_{E0}$  sont identiques. Le modèle présenté dans le tableau 1.2 est exactement le même que le modèle II du tableau 1.1 à la différence qu'un compartiment d'effet  $y$  a été ajouté (parties rouges du système d'EDO). Dans cette méthode de modélisation, il n'y a pas de transfert de médicament entre le compartiment central et la biophase. On estime simplement la quantité supposée de médicament qu'il y aurait dans le compartiment d'effet. Cette quantité reste implicite, elle se fonde dans la masse présente dans le compartiment central. C'est une façon de mettre en lumière la quantité de médicament du compartiment central qui est responsable de l'effet pharmacologique. Il devient alors possible de lier l'effet du médicament à sa concentration dans la biophase (équation 17).

$$E = E_0 + \frac{E_{MAX} \cdot C_E^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_E^\gamma} \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (17)$$

Ce modèle suggère que l'effet pharmacologique n'est pas lié à la concentration plasmatique ( $C$ ) du médicament mais à la concentration qui atteint le site d'action de la molécule ( $C_E$ ). Ainsi, si on trace la relation entre la  $C_E$  et l'effet, l'hystérèse disparaît. Ce modèle sous-entend que le décalage que l'on observe entre la concentration et l'effet est lié au temps que met le médicament pour atteindre son site d'action.

En 1993, l'équipe du Pr. Jusko met au point une série de modèles à effets indirects [45]. Le principe de ces modèles repose sur le fait que le médicament ne va pas directement agir sur la cible responsable de l'effet pharmacologique, mais sur un intermédiaire. Pour cela, l'équipe suggère que la réponse est le fruit d'un équilibre entre production et



dégradation comme décrit dans l'équation 18. C'est ce que l'on appelle aussi le "turnover model".

$$\frac{dR}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot R \quad (18)$$

$$R_{(t=0)} = R_0$$

Où  $k_{in}$  représente la constante d'ordre 0 de production de l'effet pharmacologique  $R$  tandis que  $k_{out}$  est la constante d'ordre 1 responsable de la dégradation de l'effet.  $R_0$  est le niveau basal de la réponse. Ainsi, le traitement peut inhiber (équation 19) ou stimuler (équation 20) la production ( $k_{in}$ ) ou la dégradation ( $k_{out}$ ) de la réponse au traitement via une fonction  $E_{MAX}$ .

$$I_{(t)} = 1 - \frac{I_{MAX} \cdot C}{IC_{50} + C} \quad \text{avec } 0 \leq I_{MAX} \leq 1 \quad (19)$$

$$S_{(t)} = 1 + \frac{E_{MAX} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (20)$$

Où  $I_{(t)}$  est la fonction d'inhibition et  $S_{(t)}$  la fonction de stimulation.  $I_{MAX}$  est le pourcentage d'inhibition maximale de la réponse compris entre 0 et 100%, et  $IC_{50}$  ou Concentration Inhibitrice 50, la concentration de médicament responsable de 50% de l'inhibition maximale. On remarquera que ces deux fonctions sont un cas particulier du modèle  $E_{MAX}$  sigmoïdal où la constante de Hill est fixée à 1. Le tableau 1.3 illustre les quatre modèles à effets indirects. Ces modèles sont des modèles PKPD qui décrivent l'effet en fonction du temps en combinant une partie PK (rectangles) et une partie PD (cercles). Ces modèles, en stimulant/inhibant la production/dégradation de la réponse au traitement vont mener à une réduction/accroissement de l'effet par rapport à son niveau basal.

Bien sûr, cette liste de modèles PK et PD est loin d'être exhaustive. Le choix d'un modèle dépendra de l'allure des cinétiques observées, des données à disposition ou encore des objectifs recherchés. En réalité chaque situation est unique et demande une étude particulière des relations PKPD pour trouver le modèle le plus adapté.

Modèle	Equation	Schema et profil attendu
<p><b>I</b></p> <p>Inhibition de la synthèse</p>	$\frac{dR}{dt} = k_{in} \cdot I(t) - k_{out} \cdot R$ $R_{(t=0)} = R_0$	
<p><b>II</b></p> <p>Inhibition de l'élimination</p>	$\frac{dR}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot I(t) \cdot R$ $R_{(t=0)} = R_0$	
<p><b>III</b></p> <p>Stimulation de la synthèse</p>	$\frac{dR}{dt} = k_{in} \cdot S(t) - k_{out} \cdot R$ $R_{(t=0)} = R_0$	
<p><b>IV</b></p> <p>Stimulation de l'élimination</p>	$\frac{dR}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot S(t) \cdot R$ $R_{(t=0)} = R_0$	

**Tableau 1.3. Equations, schémas et profils attendus des quatre modèles à effet indirect.** Les équations correspondant au modèle pharmacocinétique extravasculaire à 1 compartiment n'ont pas été incluses dans le tableau mais sont disponibles dans le tableau 1.1.

## C. Application à l'étude des propriétés pharmacocinétiques-pharmacodynamiques des médicaments anticancéreux

En oncologie, on s'intéresse principalement à l'évolution de la taille tumorale en fonction du temps. Ainsi, les données dont disposent les pharmacométriciens sont très souvent des tailles tumorales longitudinales, c'est-à-dire des diamètres ou volumes tumoraux mesurés de façon régulière sur un intervalle de temps déterminé. En préclinique, il est possible d'avoir à la fois des tailles tumorales sous traitement et sans traitement (groupe contrôle). Chez l'homme, mis à part les données prétraitement qui sont rarement disponibles, il n'est pas possible d'avoir de groupe contrôle car les patients atteints de cancer doivent être traités.

Dans un premier temps nous étudierons les modèles utilisés pour décrire la dynamique tumorale, puis nous verrons dans un second temps les modèles prenant en compte le processus d'angiogenèse.

### 1. Modélisation de la dynamique tumorale

La dynamique tumorale est le fruit d'un équilibre entre ce qui fait croître et ce qui fait diminuer la taille de la tumeur. Par conséquent, nous nous intéresserons d'abord aux fonctions permettant de modéliser la prolifération tumorale, puis nous étudierons l'effet des traitements anticancéreux sur la taille tumorale. Nous avons vu précédemment les différentes relations effets/concentrations (section II.B.2). Ici, nous relierons les concentrations des médicaments à la taille tumorale.

## a. Les modèles de croissance tumorale

Fonction	Equation	Profil attendu
Linéaire	$\frac{dTS}{dt} = \lambda$ $TS_{(t=0)} = TS_0$	
Exponentielle	$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS$ $TS_{(t=0)} = TS_0$	
Biphasique : exponentielle puis linéaire	$\frac{dTS}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot TS}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot TS\right)^{20}\right]^{1/20}}$ $TS_{(t=0)} = TS_0$	
Logistique générale	$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS \cdot \left[1 - \left(\frac{TS}{K}\right)^n\right]$ $TS_{(t=0)} = TS_0$	

**Tableau 1.4. Equations et profils attendus pour la fonction linéaire, exponentielle, biphasique et logistique générale**

Le tableau 1.4 présente les fonctions mathématiques les plus utilisées pour décrire la croissance tumorale seule et les profils qu'elles génèrent. Pour toutes ces fonctions,  $TS_0$  représente la taille tumorale initialement observée,  $TS$  est la taille tumorale (en [diamètre] ou [volume]) et  $\lambda$  correspond à la constante de croissance tumorale.  $\lambda$  est exprimé en [taille/temps] dans la fonction linéaire et en [temps<sup>-1</sup>] dans les fonctions exponentielle et logistique générale.

La fonction de croissance tumorale développée par Simeoni et collègues en 2004 décrit la croissance tumorale selon deux phases. Une première phase de croissance exponentielle caractérisée par une constante de vitesse  $\lambda_0$  exprimée en [temps<sup>-1</sup>] et une seconde phase de croissance linéaire de constante de vitesse  $\lambda_1$  exprimée en [taille/temps]. La taille tumorale à partir de laquelle la vitesse de croissance passe d'exponentielle à linéaire est calculée à partir du ratio  $\lambda_1/\lambda_0$  [46]. Les fonctions linéaire, exponentielle et de Simeoni présentent l'inconvénient de ne pas restreindre la croissance tumorale à un plateau. Selon ces modèles, la taille de la tumeur peut être infinie.

La fonction logistique générale est intéressante puisqu'elle permet d'obtenir des profils sigmoïdaux (tableau 1.4).  $K$  représente la taille maximale que peut atteindre la tumeur, c'est ce que l'on appelle la capacité de charge. En modifiant la valeur du paramètre  $n$ , il est possible d'obtenir différents types de profils. Lorsque  $n$  est égal à 1, la tumeur croît selon une fonction logistique. Lorsque  $n$  tend vers 0, la courbe de croissance adopte l'allure d'une courbe de Gompertz. Dans ce genre de dynamique, le plateau est atteint plus lentement qu'avec une fonction logistique.

Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, les fonctions présentées ci-dessus sont très souvent utilisées pour modéliser les croissances tumorales en fonction des données à disposition.

### ***b. Modélisation de l'effet du traitement***

L'étape suivante consiste à introduire l'effet du traitement sur la croissance tumorale. Nous avons vu dans la partie II.B.2.b comment relier la concentration du médicament à son effet pharmacologique. Dans le cas présent, l'effet se porte sur la taille tumorale.

$$\frac{dTS}{dt} = FCT - \alpha \cdot TS \quad (21)$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

Dans cette équation, l'effet du médicament (partie rouge de l'équation) ne dépend pas de sa concentration. La relation concentration/effet est constante (figure 1.8.C). *FCT* est la fonction de croissance tumorale comme décrit dans la section II.C.1.a et  $\alpha$  est la constante d'effet du traitement en [temps<sup>-1</sup>].

$$\frac{dTS}{dt} = FCT - \alpha \cdot C \cdot TS \quad (22)$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

Dans l'équation 22, l'effet du traitement dépend de la concentration ou de l'exposition du médicament (*C*). Cette concentration peut provenir du compartiment central ou d'un compartiment d'effet en fonction de la relation concentration/effet. Plus celle-ci sera grande

et plus l'effet sera important, on est donc dans une relation linéaire (figure 1.8.A). Ici,  $\alpha$  est exprimé en [concentration<sup>-1</sup>temps<sup>-1</sup>].

Pour ces relations concentration/effet linéaires, il est possible de moduler l'effet du traitement dans le temps en multipliant le terme d'effet (partie rouge dans les équations) par une fonction exponentielle décroissante (équation 23).

$$\frac{dT_S}{dt} = FCT - \alpha \cdot C \cdot TS \cdot e^{-\delta \cdot t} \quad (23)$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

$\delta$  est la constante de modulation de l'effet en [temps<sup>-1</sup>]. Ainsi, lors de l'administration du médicament, l'effet diminuera progressivement jusqu'à complètement disparaître. Cette fonction est utile pour modéliser le phénomène de résistance par exemple. Ici la résistance est dépendante du temps mais il est possible de remplacer  $t$  par l'AUC dans le cas d'une résistance dépendante de l'exposition au traitement.

$$\frac{dT_S}{dt} = FCT \cdot \left(1 - \frac{E_{MAX} \cdot C}{EC_{50} + C}\right) \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (24)$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

Une autre possibilité est de représenter l'effet du traitement de façon non linéaire grâce à un modèle du type E<sub>MAX</sub>. Avec ce modèle, il n'est pas possible de réduire la taille de la tumeur mais seulement de ralentir sa croissance entre 0 et 100% de sa vitesse (équation 24).



Ainsi, en combinant une fonction de croissance tumorale à celle de l'effet du traitement, il est possible d'obtenir une multitude de modèles permettant de décrire la dynamique tumorale.

### *c. Exemples de modèles décrivant la dynamique tumorale*

En 2012, Stein et collègues modélise la croissance de carcinomes à cellules rénales sous everolimus [47]. Dans leur modèle, la croissance de la tumeur est linéaire et l'effet de l'everolimus est dose-dépendant (équation 25).

$$\frac{dTS}{dt} = \lambda - \alpha \cdot C \cdot TS$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$
(25)

En 2009, Claret et collègues décrivent la dynamique de cancers colorectaux sous capécitabine ou 5-FU grâce à un modèle comprenant une croissance tumorale de type exponentielle et un effet dose-dépendant de la capécitabine ou 5-FU qui décroît au cours du temps du fait de la résistance de la tumeur à chacun des traitements [48] (équation 26).

$$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS - \alpha \cdot C \cdot TS \cdot e^{-\delta \cdot t}$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$
(26)

En 2011 Frances et collègues utilisent le même modèle pour décrire la dynamique de cancers du sein sous capécitabine et docétaxel, à la différence près que la croissance tumorale suit une cinétique de Gompertz [49].

Tham et collègues décrivent en 2008 la dynamique de tumeurs du poumon non à petites cellules. Ils utilisent pour cela une croissance de Gompertz qu'ils combinent à un modèle  $E_{MAX}$  avec pour concentration celle au niveau du compartiment d'effet [50] (équation 27).

$$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS \cdot \left[ TS_0 \cdot \left( 1 - \frac{E_{MAX} \cdot C_E}{AMT_{50} + C_E} \right) - TS \right] \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (27)$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

Ici, l' $AMT_{50}$  représente la dose de médicament qui inhibe 50% de la vitesse de croissance tumorale maximal.

Dans le modèle d'inhibition de la croissance tumorale développé par Simeoni et collègues en 2004, la croissance tumorale suit une cinétique biphasique (exponentielle puis linéaire) tandis que l'effet du traitement est dose-dépendant [46]. Le traitement ne tue pas les cellules instantanément mais après un certain délai que l'on peut assimiler aux perturbations cellulaires que le traitement induit. Pour modéliser ce délai, l'équipe de Simeoni a utilisé une série de trois compartiments de transit. Ce concept de compartiment de transit a été décrit quelques années plus tard par Savic et collègues pour modéliser le délai d'absorption des médicaments [51]. Ainsi, les cellules prolifératives  $TS_1$  sous traitement entrent dans un état  $TS_2$ , puis un état  $TS_3$  et enfin un stade  $TS_4$ , état à partir duquel les cellules meurent.

$$\begin{aligned}
\frac{dTS_1}{dt} &= \frac{\lambda_0 \cdot TS_1}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot TS_{TOT}\right)^{20}\right]^{1/20}} - \alpha \cdot C \cdot TS_1 \\
\frac{dTS_2}{dt} &= \alpha \cdot C \cdot TS_1 - k_d \cdot TS_2 \\
\frac{dTS_3}{dt} &= k_d \cdot (TS_2 - TS_3) \\
\frac{dTS_4}{dt} &= k_d \cdot (TS_3 - TS_4) \\
TS_{TOT} &= TS_1 + TS_2 + TS_3 + TS_4 \\
TS_{1(t=0)} &= TS_0 \text{ et } TS_{2(t=0)} = TS_{3(t=0)} = TS_{4(t=0)} = 0
\end{aligned} \tag{25}$$

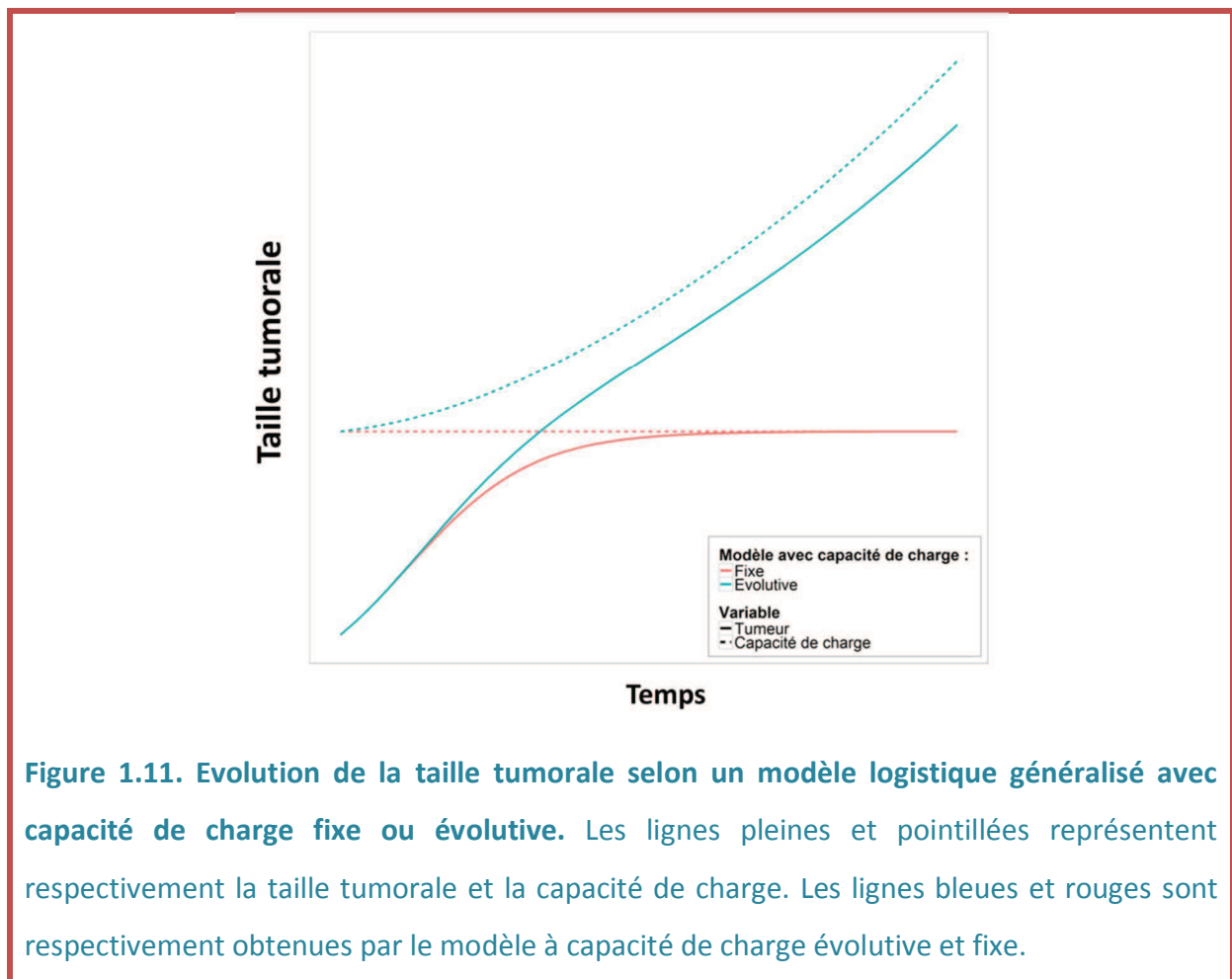
Ces exemples ne représentent qu'un faible échantillon des modèles disponibles dans la littérature. La publication de Ribba et collègues de 2014 passe en revue ces modèles et d'autres encore, comme des modèles plus complexes qui prennent en compte le mécanisme d'action des croissances tumorales [52]. Parmi eux on peut citer le modèle semi-mécanistique de Ribba publié en 2012 pour la dynamique des gliomes de bas-grade [53]. Dans ce modèle la tumeur est composée de cellules prolifératives et quiescentes sur lesquelles le traitement peut agir pour former des cellules quiescentes endommagées qui finissent par mourir si elles ne parviennent pas à réparer leur ADN.

Tous ces modèles sont plutôt adaptés pour des agents cytotoxiques, c'est-à-dire des molécules qui agissent directement sur la tumeur pour la rétrécir. Or nous avons vu que les médicaments anti-angiogéniques agissent d'abord sur la vascularisation dont la destruction entraîne la réduction retardée du volume tumoral. Par conséquent, ces modèles ne sont pas

vraiment adaptés pour modéliser l'effet de molécules inhibant l'angiogenèse ; ce qui est normal puisqu'ils ont été développés pour des molécules cytotoxiques, principaux représentants de l'arsenal thérapeutique anticancéreux jusqu'à cette dernière décennie.

## 2. Modélisation de l'angiogenèse

Il existe peu de modèles PKPD qui s'intéressent à la description des dynamiques tumorales sous molécules anti-angiogéniques. Cependant, du fait de l'essor considérable que connaissent ces composés, de plus en plus d'équipes se penchent sur le sujet et développent des modèles prenant en compte le principe de l'angiogenèse.



Le modèle le plus utilisé est le modèle logistique généralisé avec capacité de charge évolutive présenté dans la figure 1.11 et les équations 26.

$$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS \cdot \left[ 1 - \left( \frac{TS}{K} \right)^n \right]$$

$$\frac{dK}{dt} = k_{ang} \cdot TS \tag{26}$$

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

$$K_{(t=0)} = K_0$$

$k_{ang}$  est la constante de vitesse de vascularisation de la tumeur [temps<sup>-1</sup>] et  $K_0$  représente la capacité de charge initiale de même unité que la taille tumorale. Ce modèle est très intéressant pour modéliser l'angiogenèse. Il décrit la croissance tumorale selon une fonction logistique générale dont le plateau  $K$  n'est pas fixe, mais à l'inverse ajustable continuellement en fonction de la variable observée (la taille tumorale  $TS$  dans notre cas). L'analogie avec l'angiogenèse tumorale, c'est que lorsqu'une tumeur croît, ses besoins en nutriments et en oxygène augmentent. Les cellules entrent en hypoxie et favorisent le développement d'un réseau vasculaire (cf. section I.A.2). Par conséquent, la tumeur ne se stabilise pas à un plateau mais continue sa croissance. Dans la figure 1.11, la ligne pleine bleue représente la tumeur dont les cellules sont en hypoxie et la ligne pointillée bleue le réseau vasculaire dont le développement est dépendant de la quantité de cellules en hypoxie. Plus la tumeur grossira, plus son réseau vasculaire augmentera.  $k_{ang}$  nous renseigne sur la vitesse à laquelle se développe le réseau vasculaire.  $K_0$  représente la taille maximale que peut atteindre la tumeur  $TS$  étant donné son réseau vasculaire au temps zéro.

Grâce à ce modèle, il est possible de modéliser un effet anti-angiogénique en appliquant un terme d'effet au niveau de la capacité de charge comme ceux décrit dans la section II.C.1.b.

Ainsi, après adaptation selon les études, ce modèle a pu être utilisé pour évaluer l'efficacité entre différents inhibiteurs de l'angiogenèse [54] ; mettre en évidence une synergie d'action entre un agent anti-angiogénique (sunitinib) et cytotoxique (irinotecan) et ainsi proposer de meilleurs régimes de doses [34] ; être combiné à des données histologiques pour étudier l'efficacité de traitements anti-angiogéniques sur la croissance et la composition des tumeurs [55] ; ou encore étudier la quiescence de métastases lors d'une inhibition de l'angiogenèse [56].

En 2013, Rocchetti et son équipe adaptent le modèle de Simeoni (équations 25) pour étudier la dynamique de xénogreffes de diverses tumeurs (carcinome à cellules rénale, carcinome du poumon, adénocarcinome du sein et cancer de la prostate) chez des souris sous bevacizumab seul ou en combinaison avec un antimitotique [57]. Dans ce modèle, la fonction de Simeoni est combinée à un modèle  $E_{MAX}$  (équation 27).

$$\frac{dT_S}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot T_S}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot T_S\right)^{20}\right]^{1/20}} \cdot \left(1 - \frac{E_{MAX} \cdot C}{EC_{50} + C}\right) \quad \text{avec } 0 \leq E_{MAX} \leq 1 \quad (27)$$

$$T_S(t=0) = T_{S_0}$$

Ainsi, le traitement ne réduit pas la taille tumorale comme le ferait une molécule cytotoxique, mais ralentit simplement la vitesse de croissance entre 0 et 100%. Cela peut paraître inapproprié sachant qu'en théorie les anti-angiogéniques mènent à une réduction tardive du volume tumoral par destruction progressive du réseau vasculaire. Cependant, et

comme c'est le cas dans l'étude présentée par Rocchetti et collègues, la dynamique tumorale sous anti-angiogénique peut être simplement ralentie et non décroissante, faisant de ce modèle un choix intéressant.

D'autres modèles existent pour la modélisation de dynamiques tumorales sous anti-angiogéniques, mais ils font intervenir d'autres processus comme les voies de signalisation du VEGF [58] ou des interactions entre la tumeur et son environnement [59]. Ces modèles sont trop complexes et sur-paramétrés pour la description de dynamiques cancéreuses basée uniquement sur des données longitudinales de tailles tumorales. La simplicité du modèle logistique généralisé à capacité de charge évolutive et du modèle de Simeoni anti-angiogénique fait de ces modèles de parfaits candidats pour la modélisation de cinétiques tumorales sous traitement anti-angiogénique.

### III- LES TRAVAUX DE THÈSE

Nous venons de voir l'ensemble des outils biologiques et mathématiques indispensables à la bonne compréhension de ces travaux de thèse. Une brève description générale de la modélisation à effets-mixtes est disponible en annexe. Durant ces trois années, nous avons pu analyser la dynamique préclinique et/ou clinique de différentes tumeurs (carcinome à cellules rénales et schwannomes vestibulaires) traitées uniquement par un inhibiteur de *l'angiogenèse* (pazopanib, bevacizumab et everolimus). Chaque fois, nous avons tenté de construire un *modèle* prenant en compte les mécanismes pouvant expliquer les effets des molécules sur l'allure des dynamiques tumorales. Pour cela nous partons d'une analyse exploratoire des données afin d'observer attentivement les dynamiques tumorales, remarquer d'éventuelles différences entre des groupes d'individus ou encore nous donner une idée sur les *modèles* PKPD à utiliser. Parallèlement à cela, nous effectuons une recherche bibliographique sur la molécule, ainsi que sur la tumeur concernée, afin d'émettre des hypothèses sur des mécanismes potentiels qui faciliteraient la construction du *modèle*. Les objectifs du projet sont fixés préalablement avec les équipes de recherche afin de guider le processus de modélisation. Au fur et à mesure de l'avancée des projets, les résultats sont discutés avec les équipes de recherche et les objectifs mis à jour en fonction des découvertes.



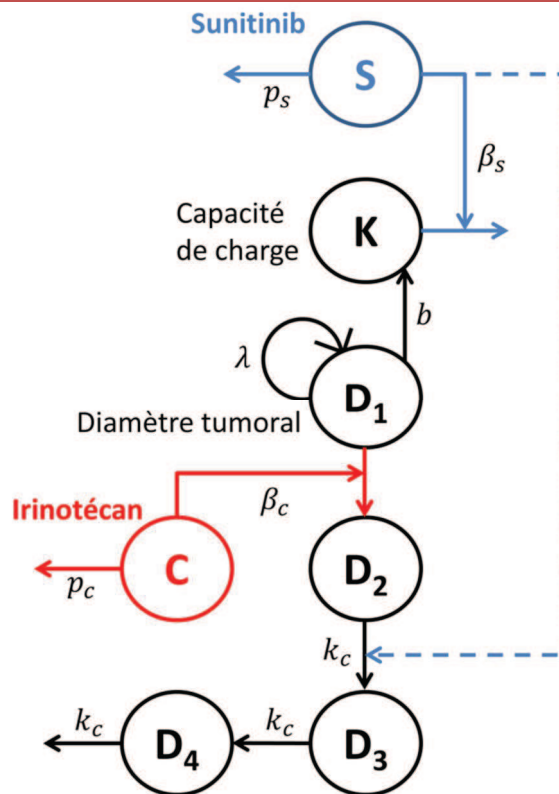
## IV- Modélisation et prédiction préclinique d'un régime de dose optimal entre le sunitinib et l'irinotécan

En guise d'introduction des travaux de thèses présentés dans les chapitres 2 et 3, nous présenterons brièvement dans cette section les travaux du Dr. Shelby Wilson, post-doctorante au sein de notre équipe, auxquels j'ai pu participer à un moindre degré. Si le lecteur désire connaître plus de détails sur cette étude, nous l'invitons à consulter la publication de Wilson et collègues 2015 (voir [34] disponible en annexe). Cette étude porte sur la modélisation de dynamiques tumorales précliniques (cancer colorectal) sous sunitinib et/ou irinotécan. En plus de décrire les croissances tumorales observées sous traitement, l'objectif de ces travaux est de caractériser l'interaction entre les deux molécules et d'optimiser l'introduction d'une dose unique d'irinotécan chez des souris sous sunitinib pendant 12 jours.

### A. Le modèle d'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse avec interaction entre le sunitinib et l'irinotécan

La figure 1.12 montre une représentation schématique du modèle final. La croissance tumorale, d'allure Gompertzienne, est décrite selon une fonction logistique généralisée avec capacité de charge évolutive (voir section II.C.2 pour description). Le sunitinib agit directement sur la capacité de charge de façon linéaire. De la même façon, l'irinotécan agit

sur les cellules tumorales en prolifération. Sous l'effet du traitement, celles-ci meurent après un certain délai modélisé par les compartiments  $D_2$  à  $D_4$  que l'on peut assimiler à différents états de dégradation cellulaire. Ce modèle est appelé modèle sans interaction puisque le sunitinib agit uniquement sur l'angiogenèse (représentée par la capacité de charge évolutive dans le modèle) et l'irinotécan sur les cellules prolifératives.



**Figure 1.12. Représentation schématique du modèle d'interaction entre le sunitinib et l'irinotécan.**  $S$  et  $C$  représentent respectivement les quantités virtuelles de sunitinib et d'irinotécan.  $D_1$  correspond aux cellules tumorales prolifératives tandis que  $D_2$ ,  $D_3$  et  $D_4$  sont des cellules en cours de dégradation.  $k_c$  est la constante de vitesse de mort cellulaire fonction de la quantité de sunitinib administrée.  $p_s$  et  $p_c$  sont respectivement les constantes d'élimination du sunitinib et d'irinotécan.  $\beta_s$  et  $\beta_c$  sont respectivement les constantes d'effet du sunitinib et d'irinotécan.  $\lambda$  est la constante de croissance tumorale et  $b$  la constante de vitesse du processus d'angiogenèse. La taille tumorale totale correspond à la somme de  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$  et  $D_4$ . D'après [34].

Un effet synergique du sunitinib sur la mort cellulaire est ajouté (ligne pointillée sur la figure 1.12). C'est ce que nous avons appelé le modèle avec interaction car cet effet du sunitinib permet d'améliorer la capacité de l'irinotécan à tuer les cellules tumorales ; on suppose par-là que les deux molécules interagissent pour obtenir l'effet final.

Les équations 28 à 35 décrivent l'ensemble du modèle final (avec interaction).

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -p_S \cdot S & S_{(t=TS)} &= 1 \\ \frac{dC}{dt} &= -p_C \cdot C & C_{(t=TC)} &= 1 \end{aligned} \quad (28)$$

$S$  correspond à la quantité de sunitinib et  $p_S$  est la constante d'élimination de la quantité de sunitinib en jour<sup>-1</sup>. De même,  $C$  est la quantité d'irinotécan en quantité et  $p_C$  est la constante d'élimination de la quantité d'irinotécan en jour<sup>-1</sup>.  $TS$  et  $TC$  sont respectivement les temps d'administration du sunitinib et de l'irinotécan.

$$\begin{aligned} \frac{dD_1}{dt} &= \lambda \cdot D_1 \cdot \left[ 1 - \left( \frac{D_1}{K} \right)^{0.1} \right] - \beta_C \cdot p_C \cdot C \cdot D_1 & D_{1(t=0)} &= D_0 \\ \frac{dK}{dt} &= b \cdot D_1^2 - \beta_S \cdot p_S \cdot S \cdot K & K_{(t=0)} &= K_0 \end{aligned} \quad (29)$$

$D_1$  correspond aux cellules tumorales en prolifération en mm,  $\lambda$  est la constante de croissance tumorale en jour<sup>-1</sup>.  $K$  est la capacité de charge évolutive en mm qui croît selon une constante de vitesse  $b$  et qui dépend d'une surface de la couche de cellules prolifératives (d'où  $D_1^2$ ). En 2011, Ribba et collègues montrent que la partie de la tumeur

responsable de l'angiogénèse est assimilable à une surface de la tumeur dont les cellules sont en hypoxie [55].  $\beta_C$  est la constante d'effet cytotoxique de l'irinotécan et  $\beta_S$  est la constante d'effet anti-angiogénique du sunitinib. Enfin,  $D_0$  et  $K_0$  représentent respectivement la taille tumorale initiale et la capacité de charge initiale.

$$\begin{aligned}
 \frac{dD_2}{dt} &= \beta_C \cdot p_C \cdot C \cdot D_1 - k_C \cdot D_2 & D_{2(t=0)} &= 0 \\
 \frac{dD_3}{dt} &= k_C \cdot D_2 - k_C \cdot D_3 & D_{3(t=0)} &= 0 \\
 \frac{dD_4}{dt} &= k_C \cdot D_3 - k_C \cdot D_4 & D_{4(t=0)} &= 0
 \end{aligned} \tag{30}$$

$D_2$ ,  $D_3$  et  $D_4$  sont les cellules tumorales en cours de dégradation.  $k_C$  est la constante de mort cellulaire qui est proportionnelle à la quantité cumulée de sunitinib entre le début du traitement et l'administration de l'irinotécan (équation 31).

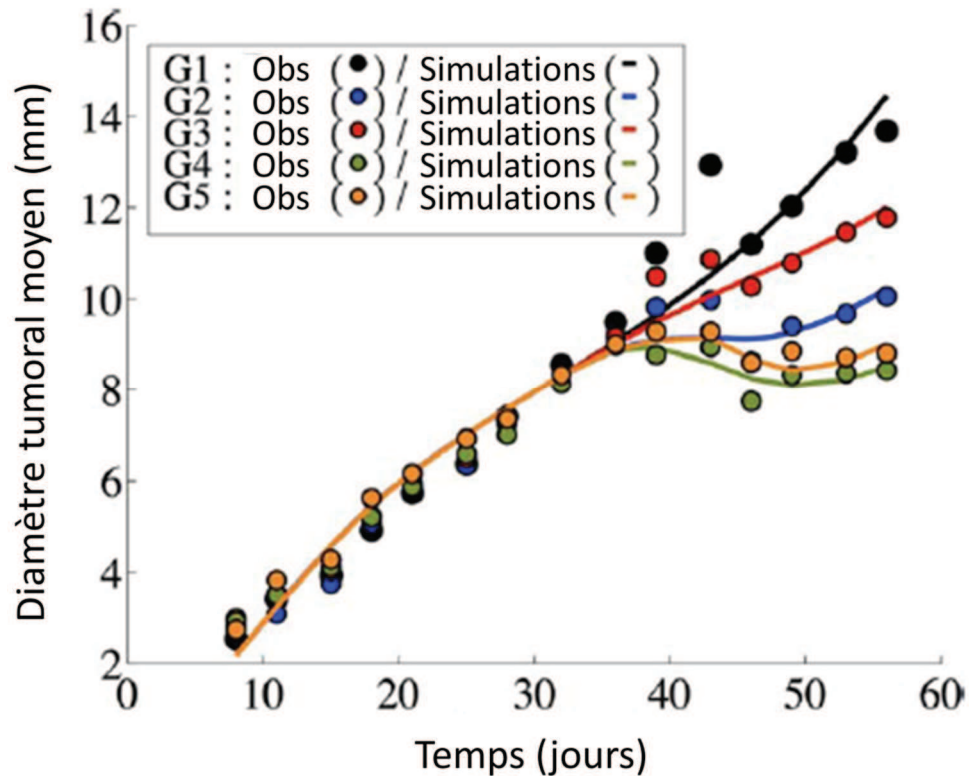
$$k_C = k_S \cdot \exp\left(\int_0^{TC} S(t)dt\right) \tag{31}$$

$k_S$  est la constante d'effet synergique du sunitinib.

La taille tumorale totale correspond à la somme des cellules prolifératives ( $D_1$ ) et des cellules en dégradation ( $D_2$  à  $D_4$ ).

## B. Résultats

### 1. Description des dynamiques tumorales



**Figure 1.13.** Courbes d'ajustement entre les simulations (lignes) et les observations (points). Le groupe 1 (points et ligne noirs) correspond au groupe contrôle. Le groupe 2 (points et ligne bleus) est le groupe ayant reçu une monothérapie de sunitinib à 40 mg/kg par voie orale pendant 12 jours. Le groupe 3 (points et ligne rouges) est le groupe ayant reçu une monothérapie d'irinotécan à 90 mg/kg par perfusion lente à J0. Le groupe 4 (points et ligne verts) et 5 (points et ligne oranges) sont les groupes ayant tous deux reçu une combinaison de sunitinib (40 mg/kg par voie orale pendant 12 jours) avec respectivement une dose unique d'irinotécan à J0 ou J15. Chaque groupe comprend 15 souris (15 observations par souris). Les simulations sont réalisées à partir des paramètres de population du modèle avec interaction. Les observations correspondent aux moyennes des observations des 15 souris pour chaque temps.

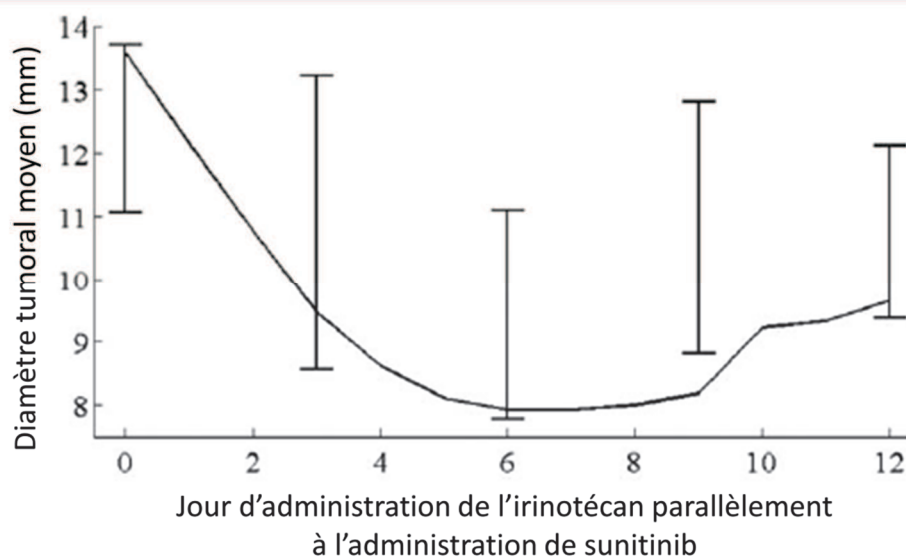
La figure 1.13 montre les ajustements entre les simulations, issues des paramètres de population du modèle avec interaction, et les dynamiques moyennes pour cinq groupes de souris. Le modèle est tout à fait capable de décrire la croissance tumorale moyenne:

- du groupe contrôle (points noirs),
- d'une monothérapie de sunitinib (points bleus). Les souris sont traitées chaque jour pendant 12 jours par voie orale,
- d'une monothérapie d'irinotécan (points rouges). Les souris sont traitées à J0 uniquement,
- d'une combinaison de sunitinib (par voie orale pendant 12 jours) et d'irinotécan (par une unique perfusion lente à J0),
- et d'une combinaison de sunitinib (par voie orale pendant 12 jours) et d'irinotécan (par une unique perfusion lente à J15).

Si l'effet synergique du sunitinib sur la mort cellulaire provoquée par l'irinotécan n'est pas pris en compte, la qualité des courbes d'ajustement et des graphiques diagnostics est moins bonne (voir [34] disponible en annexe). De plus, le test du maximum de vraisemblance (cf. annexe en fin de manuscrit pour plus de précisions) montre une significativité de l'interaction sunitinib/irinotécan (diminution d'environ 6 points par rapport au modèle sans interaction). Ce résultat est cohérent avec les hypothèses des travaux [28] et [29], présentés dans la section I.B.4, qui suggèrent que les anti-angiogéniques permettent de normaliser le réseau vasculaire tumoral et par conséquent d'améliorer la distribution des agents cytotoxiques au niveau des cellules tumorales pour en améliorer les effets sur la mort cellulaire.

## 2. Détermination du meilleur jour d'administration de l'irinotécan sous 12 jours de traitement par sunitinib

Dans une autre expérience, différents temps d'administration d'une dose unique d'irinotécan (90 mg/kg à J0, J3, J6, J9 ou J12) sous sunitinib (40 mg/kg pendant 12 jours) ont été testés. Chacun des cinq groupes est composé de six souris. Ces données n'ont pas été utilisées pour évaluer les paramètres de population et n'ont pas été décrites par le modèle d'interaction. L'objectif est d'analyser la capacité du modèle à prédire la fenêtre d'administration optimale de l'irinotécan en comparant ces prédictions aux données observées (figure 1.14). Pour cela, nous nous sommes intéressés au nadir du diamètre tumoral moyen, c'est-à-dire la taille tumorale minimale obtenue sous traitement pour chacun des groupes.



**Figure 1.14. Nadir du diamètre tumoral moyen chez des souris traitées par sunitinib pendant 12 jours en fonction de différents temps d'administration d'irinotécan.** La ligne correspond à la prédiction de la taille tumorale minimale obtenue pour différents temps d'administration d'irinotécan lors d'une thérapie sous 12 jours de sunitinib. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la taille tumorale minimale des données observées.

Nous pouvons constater que le modèle prédit le nadir le plus bas lorsque l'irinotécan est administré six jours après le début du traitement par sunitinib. Cette prédiction correspond bien à ce qui est observé expérimentalement.

Par conséquent, nous préconisons une administration de l'irinotécan 6 jours après la première administration de sunitinib pour maximiser l'effet synergique des deux molécules et augmenter l'efficacité du traitement du cancer colorectal chez la souris.

## C. Conclusion

En dépit des importantes simplifications concernant les mécanismes biologiques impliqués dans la croissance tumorale et l'angiogenèse, nous avons pu tirer parti des informations fournies par notre modèle semi-mécanistique.

En effet, celui-ci suppose que la synergie qui a lieu entre le sunitinib et l'irinotécan doit être prise en compte pour les études à venir. Ce modèle peut être utilisé comme un outil de simulation afin de guider de nouvelles études précliniques où ces deux molécules pourraient être administrées.

Enfin, ce modèle pourrait aussi servir à guider le développement d'un modèle clinique pour le traitement du cancer colorectal sous sunitinib et irinotécan. Comme nous l'avons montré dans notre étude, ce modèle pourrait aider à améliorer l'efficacité du traitement global en contribuant à la mise en place de protocoles d'administration des deux molécules, basés sur l'identification des fenêtres d'administration optimales entre les agents anti-angiogénique et cytotoxique.



## V- REFERENCES

1. Ribatti D (2008) Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* 11:3–10. doi: 10.1007/s10456-008-9092-6
2. Folkman J, Long DM, Becker FF (1963) Growth and Metastasis of Tumor in Organ Cultur. *Cancer* 16:453–467.
3. Folkman J, Merler E, Abernathy C, et al. (1971) Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis. *J Exp Med* 133:275–288.
4. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182–1186. doi: 10.1056/NEJM197111182852108
5. Cavallo T, Sade R, Folkman J, et al. (1972) Tumor angiogenesis. Rapid induction of endothelial mitoses demonstrated by autoradiography. *J Cell Biol* 54:408–420. doi: 10.1083/jcb.54.2.408
6. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, et al. (1972) Tumor Dormancy In Viva by Prevention of Neovascularization. *J Exp Med* 136:261–276.
7. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, et al. (1977) Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 35:347–356. doi: 10.1038/bjc.1977.49
8. Brouty-Boyé D, Zetter B (1980) Inhibition of Cell Motility by Interferon. *Science* (80- ) 208:516–518.

9. Maione T, Gray G, Petro J, et al. (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* (80- ) 247:77–79.
10. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. (1994) Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315–328. doi: 10.1016/0092-8674(94)90200-3
11. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88:277–285.
12. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4082–4085. doi: 10.1073/pnas.91.9.4082
13. Ingber DE, Madri JA, Folkman J (1986) A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids - induction of capillary basement-membrane dissolution. *Endocrinology* 119:1768–1775.
14. Satchi-Fainaro R, Mamluk R, Wang L, et al. (2005) Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. *Cancer Cell* 7:251–261. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.007
15. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401–410. doi: 10.1038/nrc1093
16. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, et al. (1979) Induction of a Fibrin-Gel Investment: An Early Event in Line 10 Hepatocarcinoma Growth Mediated by Tumor-Secreted Products. *J Immunol* 122:166–174.

17. Senger D, Perruzzi C, Feder J, et al. (1986) A Highly Conserved Vascular Permeability Factor Secreted by a Variety of Human and Rodent Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 46:5629–5632.
18. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851–858. doi: 10.1016/0006-291X(89)92678-8
19. Ribatti D (2007) The contribution of Harold F. Dvorak to the study of tumor angiogenesis and stroma generation mechanisms. *Endothelium* 14:131–135. doi: 779704791 [pii]\n10.1080/10623320701421651
20. Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. (2000) Hypoxia inducible factor-?? binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275:25733–25741. doi: 10.1074/jbc.M002740200
21. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, et al. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391–400. doi: 10.1038/nrd1381
22. Chu QS-C (2009) Aflibercept (AVE0005): an alternative strategy for inhibiting tumour angiogenesis by vascular endothelial growth factors. *Expert Opin Biol Ther* 9:263–71. doi: 10.1517/14712590802666397
23. EMA (2013) Résumé des Caractéristiques du Produit: AFLIBERCEPT. 1–14.
24. Boutayeb S, Zakkouri FZ, Aitelhaj M, et al. (2012) Bilan des inhibiteurs de protéine tyrosine kinase dans le traitement des cancers. *Pathol Biol* 60:229–233. doi:

- 10.1016/j.patbio.2012.05.007
25. Pópulo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13:1886–1918. doi: 10.3390/ijms13021886
  26. Chiang GG, Abraham RT (2007) Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13:433–442. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.001
  27. Lane H a., Wood JM, McSheehy PMJ, et al. (2009) mTOR Inhibitor RAD001 (Everolimus) Has Antiangiogenic/Vascular Properties Distinct from a VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Cancer Res* 15:1612–1622. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2057
  28. Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (80- )* 307:58–62. doi: 10.1126/science.1104819
  29. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, et al. (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8:610–22. doi: 10.1038/nrn2175
  30. Gibaldi M, Levy G (1976) Pharmacokinetics in clinical practice: I. concepts. *JAMA* 235:1864–1867.
  31. Rovei V, Chanoine F, Benedetti SM (1982) Pharmacokinetics of theophylline: a dose-range study. *Br J Clin Pharmacol* 14:769–778. doi: 10.1111/j.1365-2125.1982.tb02035.x
  32. Buil-Bruna N, López-Picazo J-M, Moreno-Jiménez M, et al. (2014) A population pharmacodynamic model for lactate dehydrogenase and neuron specific enolase to predict tumor progression in small cell lung cancer patients. *AAPS J* 16:609–19. doi:

10.1208/s12248-014-9600-0

33. Gumbo T, Louie A, Liu W, et al. (2007) Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: Integrating pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2329–2336. doi: 10.1128/AAC.00185-07
34. Wilson S, Tod M, Ouerdani A, et al. (2015) Modeling and predicting optimal treatment scheduling between the antiangiogenic drug sunitinib and irinotecan in preclinical settings. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 720–727. doi: 10.1002/psp4.12045
35. Mager DE, Woo S, Jusko WJ (2009) Review Scaling Pharmacodynamics from In Vitro and Preclinical Animal Studies to Humans. 24:16–24.
36. Mehrotra N, Gupta M, Kovar a, et al. (2007) The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy. *Int J Impot Res* 19:253–264. doi: 10.1038/sj.ijir.3901522
37. Mazzocco P, Honnorat J, Ducray F, et al. (2015) Increasing the Time Interval between PCV Chemotherapy Cycles as a Strategy to Improve Duration of Response in Low-Grade Gliomas: Results from a Model-Based Clinical Trial Simulation. *Comput Math Methods Med* 1–7. doi: 10.1155/2015/297903
38. Buil-Bruna N, Sahota T, Lopez-Picazo J-M, et al. (2015) Early Prediction of Disease Progression in Small Cell Lung Cancer: Toward Model-Based Personalized Medicine in Oncology. *Cancer Res* 75:2416–2425. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2584
39. Mazzocco P, Barthélémy C, Kaloshi G, et al. (2015) Prediction of Response to

- Temozolomide in Low-Grade Glioma Patients Based on Tumor Size Dynamics and Genetic Characteristics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. doi: 10.1002/psp4.54
40. Levy G (1994) Pharmacologic target-mediated drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 56:248–252.
  41. Mager DE, Jusko WJ (2001) General Pharmacokinetic Model for Drugs Exhibiting Target-Mediated Drug Disposition. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28:507–532.
  42. Mager DE, Krzyzanski W (2005) Quasi-equilibrium pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition. *Pharm Res* 22:1589–1596. doi: 10.1007/s11095-005-6650-0
  43. Gibiansky L, Gibiansky E, Kakkar T, et al. (2008) Approximations of the target-mediated drug disposition model and identifiability of model parameters. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 35:573–591. doi: 10.1007/s10928-008-9102-8
  44. Sheiner L, Stanski DR, Vozeh S, et al. (1979) Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 25:358–371.
  45. Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ (1993) Comparison of Four Basic Models of Indirect Pharmacodynamic Responses. *J Pharmacokinet Biopharm* 21:457–478.
  46. Simeoni M, Magni P, Cammia C, et al. (2004) Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res* 64:1094–101.

47. Stein A, Wang W, Carter A a, et al. (2012) Dynamic tumor modeling of the dose-response relationship for everolimus in metastatic renal cell carcinoma using data from the phase 3 RECORD-1 trial. *BMC Cancer* 12:311. doi: 10.1186/1471-2407-12-311
48. Claret L, Girard P, Hoff PM, et al. (2009) Model-based prediction of phase III overall survival in colorectal cancer on the basis of phase II tumor dynamics. *J Clin Oncol* 27:4103–8. doi: 10.1200/JCO.2008.21.0807
49. Frances N, Claret L, Bruno R, et al. (2011) Tumor growth modeling from clinical trials reveals synergistic anticancer effect of the capecitabine and docetaxel combination in metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 68:1413–9. doi: 10.1007/s00280-011-1628-6
50. Tham L-S, Wang L, Soo R a, et al. (2008) A pharmacodynamic model for the time course of tumor shrinkage by gemcitabine + carboplatin in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 14:4213–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4754
51. Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, et al. (2007) Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 34:711–726. doi: 10.1007/s10928-007-9066-0
52. Ribba B, Holford NH, Magni P, et al. (2014) A review of mixed-effects models of tumor growth and effects of anticancer drug treatment used in population analysis. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol* 3:e113. doi: 10.1038/psp.2014.12
53. Ribba B, Kaloshi G, Peyre M, et al. (2012) A tumor growth inhibition model for low-grade glioma treated with chemotherapy or radiotherapy. *Clin Cancer Res* 18:5071–

80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0084
54. Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, et al. (1999) Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res* 59:4770–5.
55. Ribba B, Watkin E, Tod M, et al. (2011) A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *Eur J Cancer* 47:479–90. doi: 10.1016/j.ejca.2010.10.003
56. Benzekry S, Gandolfi A, Hahnfeldt P (2014) Global dormancy of metastases due to systemic inhibition of angiogenesis. *PLoS One* 9:26–30. doi: 10.1371/journal.pone.0084249
57. Rocchetti M, Germani M, Del Bene F, et al. (2013) Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth after administration of an anti-angiogenic agent, bevacizumab, as single-agent and combination therapy in tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:1147–57. doi: 10.1007/s00280-013-2107-z
58. Lignet F, Benzekry S, Wilson S, et al. (2013) Theoretical investigation of the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy in xenografted mice. *J Theor Biol* 320:86–99. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.12.013
59. Pinho STR, Bacelar FS, Andrade RFS, et al. (2013) A mathematical model for the effect of anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer tumours by chemotherapy. *Nonlinear Anal Real World Appl* 14:815–828. doi: 10.1016/j.nonrwa.2012.07.034



## **CHAPITRE 2**

---

# **MODELISATION DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE TUMORALE ET DE L'ANGIOGENESE POUR DECRIRE LES EFFETS CLINIQUES DU PAZOPANIB DANS LE TRAITEMENT DU CARCINOME RENAL**

---

## I- PUBLICATION

### **Preclinical Modeling of Tumor Growth and Angiogenesis Inhibition to Describe Pazopanib Clinical Effects in Renal Cell Carcinoma**

Aziz Ouerdani<sup>1</sup>, Herbert Struemper<sup>2\*</sup>, A. Benjamin Suttle<sup>2,†</sup>, Daniele Ouellet<sup>2</sup>, Benjamin Ribba<sup>1,‡</sup>

<sup>1</sup>Inria, project team NuMed, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.

<sup>2</sup>GlaxoSmithKline, Clinical Pharmacology Modeling & Simulation, Research Triangle Park, NC, USA.

**Running title:** Tumor growth and angiogenesis inhibition modeling of pazopanib in mice and humans

---

\* Current affiliation: Quantitative Clinical Development, Parexel, International, 2520 Meridian Pkwy, Raleigh, North Carolina.

† Current affiliation: Salix Pharmaceuticals, Inc. 8510 Colonnade Center Drive, Raleigh, North Carolina.

‡ Corresponding author: benjamin.ribba@gmail.fr; Tel: +33 4 89 73 24 51

## Abstract

Objectives: To leverage tumor size data from preclinical experiments to propose a model of tumor growth and angiogenesis inhibition for the analysis of pazopanib efficacy in renal cell carcinoma (RCC) patients.

Methods: We analyzed tumor data in mice with RCC CAKI-2 cell line treated with pazopanib. Clinical tumor size data obtained in a subset of patients with RCC were also analyzed. A model accounting for the processes of tumor growth, angiogenesis, and drug effect was developed.

Results: The final tumor model was composed of two variables: the tumor and its vasculature. Our results show that, both in mice and in humans, pazopanib exhibits a dual mechanism of action, and parameter estimation values highlight the inherent difference between mice and humans in the time scale of tumor size response.

Conclusion: We developed a semi-mechanistic tumor growth inhibition model that takes into account tumor angiogenesis in order to describe the effects of pazopanib in mice. Analyzing rich preclinical data with a semi-mechanistic model may be a relevant approach to facilitate the description of sparse clinical longitudinal tumor size data and to provide insights for the understanding of the drug mechanisms of action in patients.

**Keywords:** Oncology, Disease progression modeling, Population pharmacokinetics-pharmacodynamics, Mixed-effect models, Model based drug development

## Introduction

Targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as pazopanib (VOTRIENT; GlaxoSmithKline, UK) is widely used in the treatment of renal cell carcinoma (RCC). Pazopanib has multiple targets, including the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors 1, 2 and 3; the platelet-derived growth factor receptors (PDGFR)  $\alpha$  and  $\beta$ , and the stem cell factor receptor c-KIT<sup>1</sup>. The mechanisms of action of pazopanib, like those of other multi-target inhibitors, are complex and not fully understood. The underlying complexity of multi-target inhibitors makes the development of these drugs challenging, especially when translating from mice to humans<sup>2</sup>. In this purpose, many compounds that showed excellent antitumor properties in animals did not performed as well in patients which resulted in drug development failure. It is the case for the compounds SU5416, TNP-470 and IM862 for example<sup>3</sup>.

Population modeling is recognized as a relevant method for characterizing tumor response to anticancer drugs. Tumor growth and inhibition (TGI) models have been used to leverage data on early tumor size dynamics with the aim of optimizing the design of late phase trials<sup>4</sup>.<sup>5</sup> Several models have been published that describe the time course of tumor size in RCC. Maitland *et al.* successfully applied the model of Wang *et al.* to analyze tumor size time course in RCC patients treated with sorafenib<sup>6</sup>. Houk *et al.*<sup>7</sup> used the model of Claret *et al.*<sup>8</sup> to describe the efficacy of sunitinib in metastatic RCC patients, and Stein *et al.*<sup>9</sup> proposed another model to describe tumor size kinetics in metastatic RCC patients treated with everolimus in a phase III trial. Bonate and Suttle developed a model that specifically addresses tumor size response in RCC patients treated with pazopanib<sup>10</sup>. Their model relies on an empiric representation of tumor shrinkage due to treatment, and this representation

does not specifically capture the compound's antiangiogenic action. Like the models reviewed above, this model was developed on the basis of tumor size data.

The models described above bear high resemblance to one another, despite considering drugs with different mechanisms of action. This similarity may be due to the fact that in most cases, longitudinal tumor size measurements in treated patients are characterized by an initial decrease eventually followed by a tumor regrowth. The designs of the clinical trials, as well as the need to remove patients from the study when tumor size increases, are significant constraints for the development of detailed mechanistic models.

To develop more accurate mechanistic models of tumor response, it is necessary to take advantage of any available complementary data associated with the clinical dataset analyzed. In previous work, carried out in a preclinical setting, we used histological data to complement tumor size records and proposed a multiscale model for tumor growth and angiogenesis<sup>11</sup>. The use of data on circulating biomarkers can also supplement the information encompassed in tumor size measurements to better predict patients' outcomes in response to treatment (see<sup>12, 13, 14</sup> as examples). Challenges in translating data from animal models in oncology are frequently cited as a critical impediment to drug development efforts<sup>15</sup>, yet herein we propose that preclinical tumor size data can provide sufficient insights to facilitate the development of a more detailed mechanistic model of clinical tumor size response. Specifically, we show that the analysis of tumor size time course data from preclinical studies can be used to obtain a more detailed description of pazopanib effect in patients and can lead to the development of a mechanistic model to predict pazopanib clinical efficacy.

## Materials and methods

### *Preclinical data*

Female CB-17 SCID mice, aged 8–10 weeks, were housed in specific-pathogen-free environments and subcutaneously injected with a suspension of RCC CAKI-2 tumor cells. Once their tumors had grown to a size between 100 and 250 mm<sup>3</sup>, mice were randomly distributed into dosing groups (8 mice per group) and received vehicle control, or 10, 30 or 100 mg/kg of pazopanib. The drug was administered once daily by oral gavage for 24 days. Twice weekly for the duration of the experiment, mice were weighed and tumor volumes were evaluated (8 observations of each type per mouse). The length and width of tumors were measured by handheld calipers, and tumor volume was calculated according to the following formula: tumor volume = (Length × Width<sup>2</sup>)/2.

### *Clinical data*

Clinical data were obtained from a multicenter, open-label phase II study (NCT00244764)<sup>16</sup>. We had access to a subset of 47 patients, aged 43 to 79 years, with advanced and/or metastatic RCC of predominantly clear-cell histology and obviousness of measurable disease by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). Patients were included in the dataset if they were treatment naïve or had previously undergone a single treatment with systemic immunotherapy by cytokines, and/or had benefited from prior surgery (nephrectomy) and/or radiotherapy. Additional eligibility criteria included an Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) of 0 or 1, and adequate hematologic, hepatic, and renal function. The clinical trial was conducted according to the International Conference on Harmonization Guidelines for Good Clinical Practice and the

amended Declaration of Helsinki. Patients were administered a dose of 800 mg of pazopanib once daily that was reduced in case of intolerance. Treatment was stopped because of unacceptable toxicity, withdrawal of consent for any reason or disease progression (PD) assessed through RECIST 1.1<sup>17</sup>. No dose interruptions were reported within the dataset despite the events listed above. Disease assessments (sum of longest tumor diameter; SLD) using computed tomography or magnetic resonance imaging were scheduled prior to initiation of pazopanib treatment (at baseline), at weeks 8 and 12 following treatment commencement, and every 8 weeks thereafter until progression.

### ***Mixed effect modeling of tumor growth and effects of drug treatment***

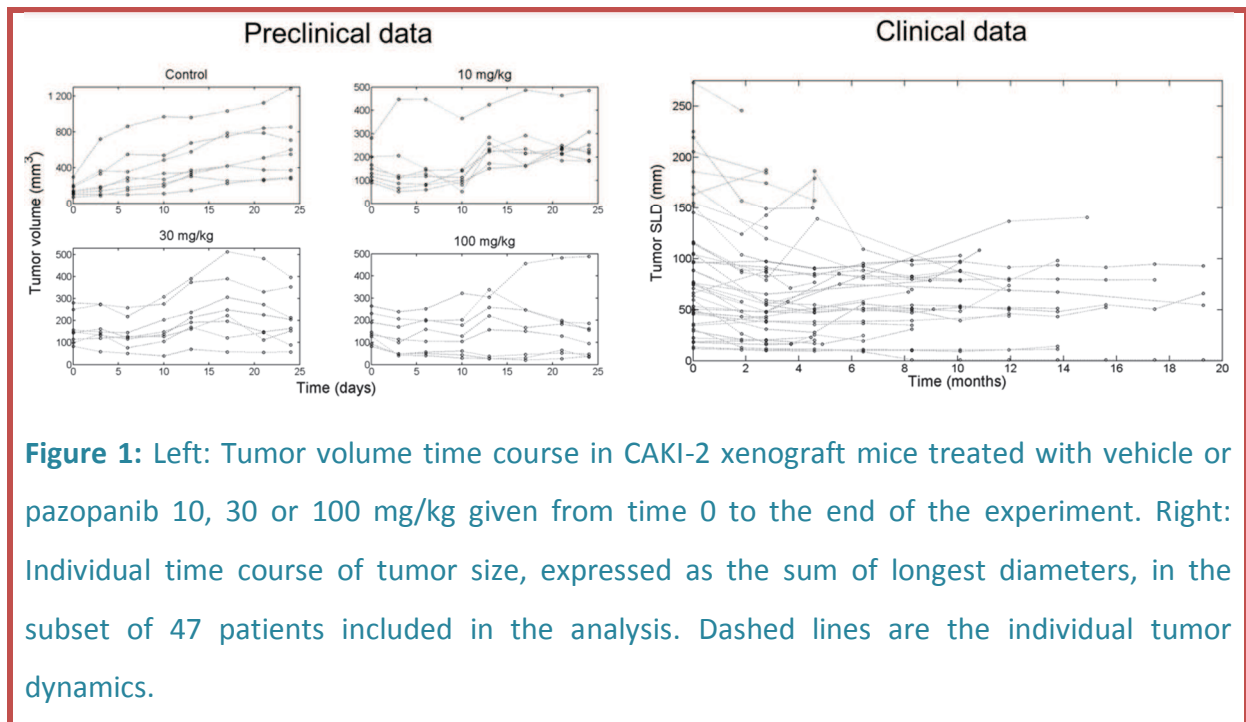
Nonlinear mixed-effect modeling (NLME) enables variability among individuals to be integrated into the description of any given process<sup>18</sup>. In our case, the structural part of the model corresponds to the solution of a system of ordinary differential equations (ODEs). In modeling tumor growth and effects of drug treatment, ODEs are generally written as a balance between the net growth and the drug-induced decay of the tumor size. Net growth can be represented by several types of functions, for example, linear, exponential, or logistic. The term representing drug-induced decay can be constant or exponential, driven by drug exposure, and it can incorporate a resistance term or a delay term to accommodate a wide range of tumor response shapes (see<sup>8, 9, 19, 20, 21, 22, 23</sup> and<sup>24</sup> for a review).

To develop the statistical component of the model, we considered additive, proportional and combined residual error models for both preclinical and clinical data and assumed that the individual parameters were log-normally distributed.

The preclinical and clinical data were analyzed using the First Order Conditional Estimation with Interaction method (FOCEI with NONMEM 7.2). The value of Bayesian information criterion (BIC) was used to drive the process of model selection. Validity of candidate models was also evaluated through the percent of relative standard error (RSE) of the parameters and goodness of fit plots such as visual predictive check (VPC). VPC were performed by simulating 500 studies from where the 95% confidence intervals for the 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles were calculated. For the preclinical data, VPC plots were stratified according to the doses administered. For the clinical data, we performed prediction-corrected VPC, as most of the patients experienced dose reduction (see <sup>25</sup> for further details).

## Results

Figure 1 (left panel) presents tumor volume time course data in mice treated with vehicle or pazopanib 10, 30 or 100 mg/kg.



**Figure 1:** Left: Tumor volume time course in CAKI-2 xenograft mice treated with vehicle or pazopanib 10, 30 or 100 mg/kg given from time 0 to the end of the experiment. Right: Individual time course of tumor size, expressed as the sum of longest diameters, in the subset of 47 patients included in the analysis. Dashed lines are the individual tumor dynamics.



In a first stage, we analyzed the data from animals (both control and treated). Testing models of increasing complexity resulted in a final model composed of a system of two ordinary differential equations (see supplementary table S1 for the full list of tested models). One equation represents the tumor volume ( $TS$ ) while the other describes the tumor carrying capacity ( $K$ ), which is defined as the maximal tumor volume or mass supported by the current level of tumor vascularization. We suppose that the tumor, through pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), is capable of extending its carrying capacity ( $K$ ). Thereby the capacity ( $K$ ) is expected to always increase. This hypothesis is consistent with RCC growth as it overexpresses pro-angiogenic factors due to the von Hippel Lindau (VHL) gene mutation leading to a continuous and anarchic tumor angiogenesis<sup>26</sup>. Tumor vasculature can be seen as a growth-limiting factor supporting the concept of tumor carrying capacity. We assume that tumor angiogenesis is dependent on the tumor volume ( $TS$ ) as more pro-angiogenic factors are synthesized when the quantity of tumor cells increases. To modulate the relationship between the carrying capacity ( $K$ ) and the tumor volume ( $TS$ ), we introduce an empirical parameter  $n$ .

The tumor growth and angiogenesis inhibition model can be written as follows:

$$\begin{aligned} \frac{dTS}{dt} &= \lambda \cdot TS \cdot \left(1 - \frac{TS}{K}\right) - \alpha \cdot e^{-\delta t} \cdot TS \\ \frac{dK}{dt} &= k_{ang} \cdot TS^n - \gamma \cdot K \end{aligned} \tag{1}$$

where  $TS$  is the tumor volume in  $\text{mm}^3$  and  $\lambda$  its growth rate constant (in 1/day). The parameter  $k_{ang}$  is the capacity rate constant (in 1/day). It regulates how quickly the carrying capacity grows. The parameter  $n$  was not identifiable but was tested using likelihood

profiling with different arbitrary values. Specifically, we varied the value of  $n$  between 0.5 and 3 to cover a sufficient range of angiogenesis potency (tested values: 0.5, 2/3, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3). As proposed by Hahnfeldt et al.<sup>27</sup>, when  $n=2/3$  the model assume that the tumor angiogenesis (represented by the carrying capacity term  $K$ ) is depending on a surface area of the tumor volume. We evaluated the fit of the model by analyzing changes in the BIC and individual fits. The best results were obtained with an  $n$  value of 1.  $\gamma$  (1/day),  $\alpha$  (1/day) and  $\delta$  (1/day) are constants representing the antiangiogenic effect; the putative cytotoxic effect; and the resistance on the cytotoxic effect of pazopanib respectively.

Based on the individual fits, goodness of fit plots and BIC values (table S1), assumption of a single effect of pazopanib on the tumor carrying capacity  $K$  (representing its antiangiogenic action) was not sufficient to optimally describe the tumor data since both observed initial and long-term tumor shrinkage could not be fitted by the model. The final model integrated a second direct effect on the tumor volume  $TS$ , which can be attributed to a cytotoxic effect of the drug. In addition, in line with previous suggestions<sup>8</sup>, we added a resistance term ( $\delta$ ) that decreases the cytotoxic effect on tumor volume with time (Eq. 1). A resistance on the cytotoxic effect depending on the drug exposure was tested but resulted in worst BIC value and individual fits. This is probably due to the fact that the variability of patients' drug exposures was small and not sufficient to discriminate an effect on drug resistance.

Drug exposure (area under the curve; AUC) was also included in the model; we used the following covariate models to describe its effect on the drug efficacy parameters  $\alpha$  and  $\gamma$ :

$$\alpha = \alpha_0 \cdot AUC^{\beta_\alpha} \quad (2)$$

$$\gamma = \gamma_0 \cdot AUC^{\beta_\gamma} \quad (3)$$

where  $AUC$  is treated as a continuous variable with values of 220.2, 656.8 and 1140.8  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ , for the doses of 10, 30 and 100 mg/kg, respectively, as reported in separate preclinical pharmacokinetic studies<sup>§</sup>.  $\alpha_0$  and  $\gamma_0$  stand respectively for the “baseline” population values of  $\alpha$  and  $\gamma$ ; and  $\beta_\alpha$  and  $\beta_\gamma$  represent the two covariate model parameters to be estimated. As an assumption, no inter-individual variability was associated to these two parameters. Pazopanib displays a nonlinear pharmacokinetics which mechanisms seem to be due to the drug absorption process. Overall, the model contains seven structural parameters ( $\lambda, k_{ang}, \alpha, \delta, \gamma, TS_0, K_0$ ). The initial tumor volume ( $TS_0$ ) was set to the observed value so that only six model parameters were estimated. To avoid bias due to sampling errors, we took into account the values of the residual error parameters in the initial condition of tumor size. Random effects were assumed for all model parameters except for parameter  $k_{ang}$  as its estimation was associated with numerical instabilities. Data was not log-transformed as this transformation did not result in any improvement of the estimation.

In contrast to other tumor models, the proposed model (Eq. 1) can assume for certain parameter values a finite, non-zero equilibrium, i.e., represent prolonged stable disease. To understand this long-term behavior of the model, note that asymptotically (i.e., for large values of  $t$ ), in the particular case of  $n = 1$ , an infinite set of equilibrium  $TS = K > 0$  can be reached if  $k_{ang} = \gamma$ . For  $n$  values other than 1, the model can also assume a unique non-zero equilibrium:

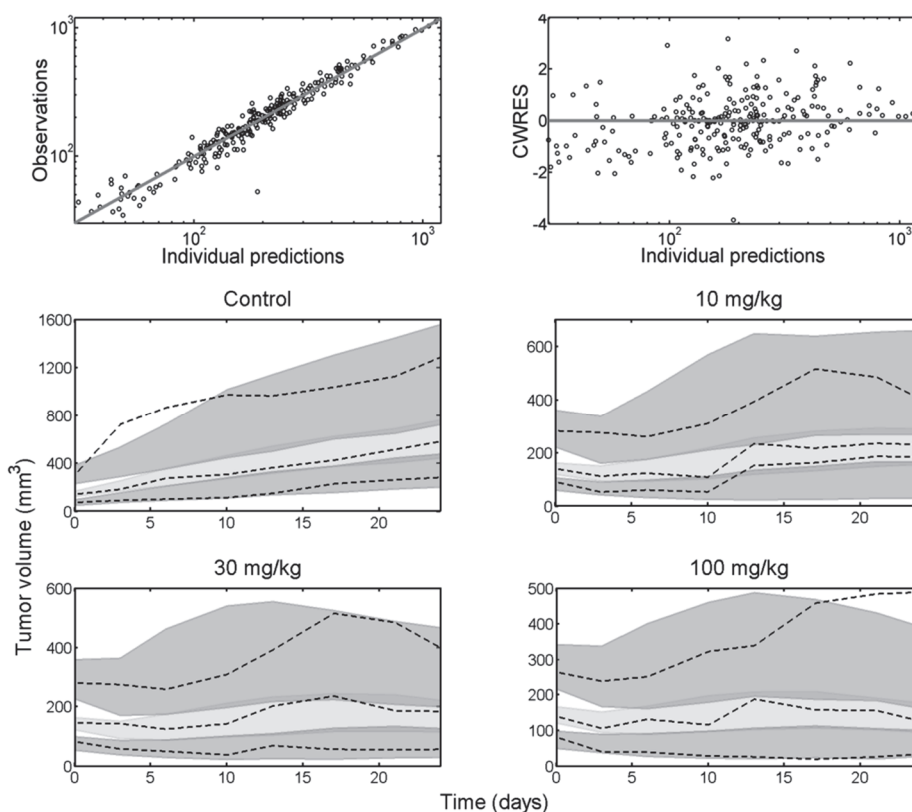
<sup>§</sup> [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2009/022465s000\\_PharmR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022465s000_PharmR.pdf)

$$TS = K = \left( \frac{\gamma}{k_{ang}} \right)^{\frac{1}{n-1}} \quad (4)$$

$TS = K = 0$  defines an equilibrium given that  $n$  is strictly greater than 0.

The combination of both antiangiogenic and cytotoxic effects led to the best diagnostics. Overall, the proposed model provided an adequate description of the tumor volume data within the four treatment groups (see figure 2 for basic goodness of fit plots and VPCs stratified by dose).

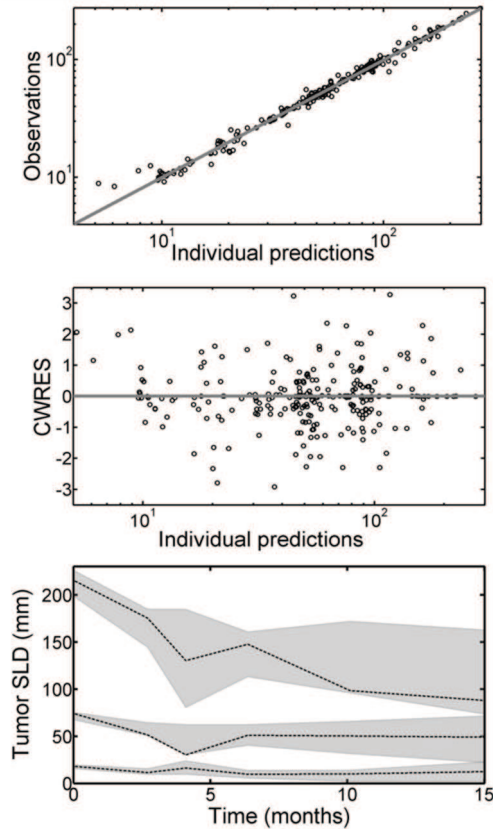
The same model was applied to the analysis of the clinical data presented in Figure 1 (right panel). For this analysis, it was necessary to apply a correction on the empirical parameter  $n$ , which was set in this case to the value 0.5. This value allows the model to better predict the tumor regrowth, as well as the second decrease due to the long-term antiangiogenic effect, by reducing the potency of the tumor angiogenesis. Therefore, this new value of  $n$  significantly improved the fits of the model's predictions to the tumor size dynamics of individual patients. For this analysis, inter-individual variability (IIV) of the parameters  $K_0$  and  $k_{ang}$  was fixed to 0; we verified that increasing the IIV of  $K_0$  and  $k_{ang}$  did not improve the objective function. The model also incorporated mean exposure at each dose level (800 mg daily and at reduced doses). To identify these mean exposure levels in the absence of pharmacokinetic data, we fitted an Emax model to mean AUC values reported in previous clinical trials; this approach enabled us to account for the less-than-dose-proportional increase in AUC. Data from 5 clinical trials that investigated pazopanib doses of 5 mg to 2000 mg administered once daily were pooled for the analysis<sup>28, 29, 30, 31, 32</sup>.



**Figure 2:** Up, left: Observed versus predicted tumor volumes for individual mice across treatment groups (vehicle, 10, 30, 100 mg/kg). Up, right: Conditional weighted residuals (CWRES) versus individual predictions. VPC stratified by the dose for the preclinical analysis (n=8 mice per group). Middle, left: VPC for the vehicle group. Middle, right: 10 mg/kg. Bottom, left: 30 mg/kg. Bottom, right: 100 mg/kg. The dashed lines represent the 5%, 50% and 95% percentiles of the observed data. The colored areas represent the 95% prediction areas for the respective percentiles. VPC should be interpreted carefully as the number of mice for each group is small. Therefore, observed 5th and 95th percentiles are equals to the smallest and biggest tumor dynamic respectively. Nevertheless the model is describing well the median observed tumor dynamic for each group.

According to the Emax model, mean exposure was 771.6  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  (range= 629.4-802.4  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ) corresponding to a mean dose of 727 mg (range: 473-800 mg) through the population of 47 patients. Predict patients' exposures from the Emax model may certainly introduce a degree of uncertainty which complicates the comparison of tumor and drug specific parameters between mice and humans.

As in the case of the preclinical data, we ruled out the possibility that simpler including models assuming a single (antiangiogenic or cytotoxic) effect of the drug would be sufficient to describe the clinical data (table S1). Basic goodness of fit plots and VPC plots (figure 3) indeed indicated that a model that assumes both effects is more appropriate.



**Figure 3:** Up: Observed tumor size expressed as sum of the longest diameters versus the model's individual predictions. Middle: CWRES versus individual predictions. Bottom: prediction-corrected VPC for the clinical analysis. The dashed lines represent the 5%, 50% and 95% percentiles of the observed data, and the colored areas stand for the 95% prediction areas for the respective percentiles.

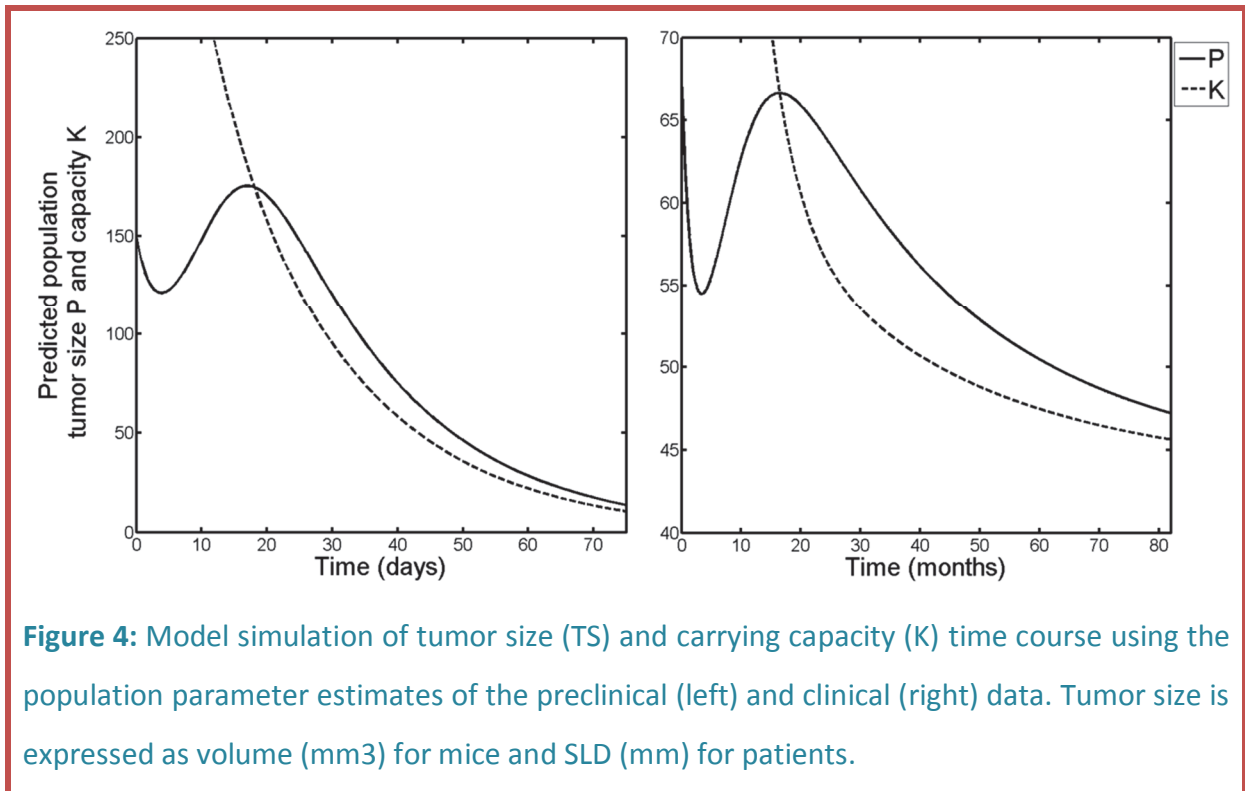
Parameters	Unit	Preclinical results		Clinical results		
		Estimates (RSE %)	IIV (RSE %)	Estimates (RSE %)	IIV (RSE %)	
	$\lambda$	day <sup>-1</sup>	0.166(24)	53(108)	0.0021(6)	82(35)
	$K_0$	mm <sup>3</sup>   mm	543(15)	36(77)	329(25)	Fixed to 0
	$k_{ang}$	day <sup>-1</sup>	0.0183(58)	Fixed to 0	0.0392(22)	Fixed to 0
Model parameters	$\gamma$	day <sup>-1</sup>	0.007(29)	19(127)	0.0023(9)	31(51)
	$\beta_\gamma$		0.332(15)		0.142(7)	
	$\alpha$	day <sup>-1</sup>	0.251(13)	24(96)	0.0032(2)	62(29)
	$\beta_\alpha$		Fixed to 0		0.125(14)	
	$\delta$	day <sup>-1</sup>	0.196(26)	42(103)	0.0153(3)	101(45)
Residual error	$\varepsilon_1$ (proportional)	%	14 (23)		8 (2)	
	$\varepsilon_2$ (additive)	mm <sup>3</sup>   mm	3 (17)		1 (3)	

**Table 1:** Interindividual variability (IIV) is approximated by the root of the variance (omega) estimated by NONMEM and expressed as a percentage together with standard errors of estimates (RSE). In both preclinical and clinical settings, the best error model was a combination of proportional ( $\varepsilon_1$ ) and additive ( $\varepsilon_2$ ) parameters. They are both expressed as standard deviations that are calculated from variances (sigma) estimated by NONMEM.  $\varepsilon_1$  is presented as a percentage, whereas  $\varepsilon_2$  is the standard deviation in the unit of the observed variable (mm<sup>3</sup> and mm for preclinical and clinical tumor size, respectively)

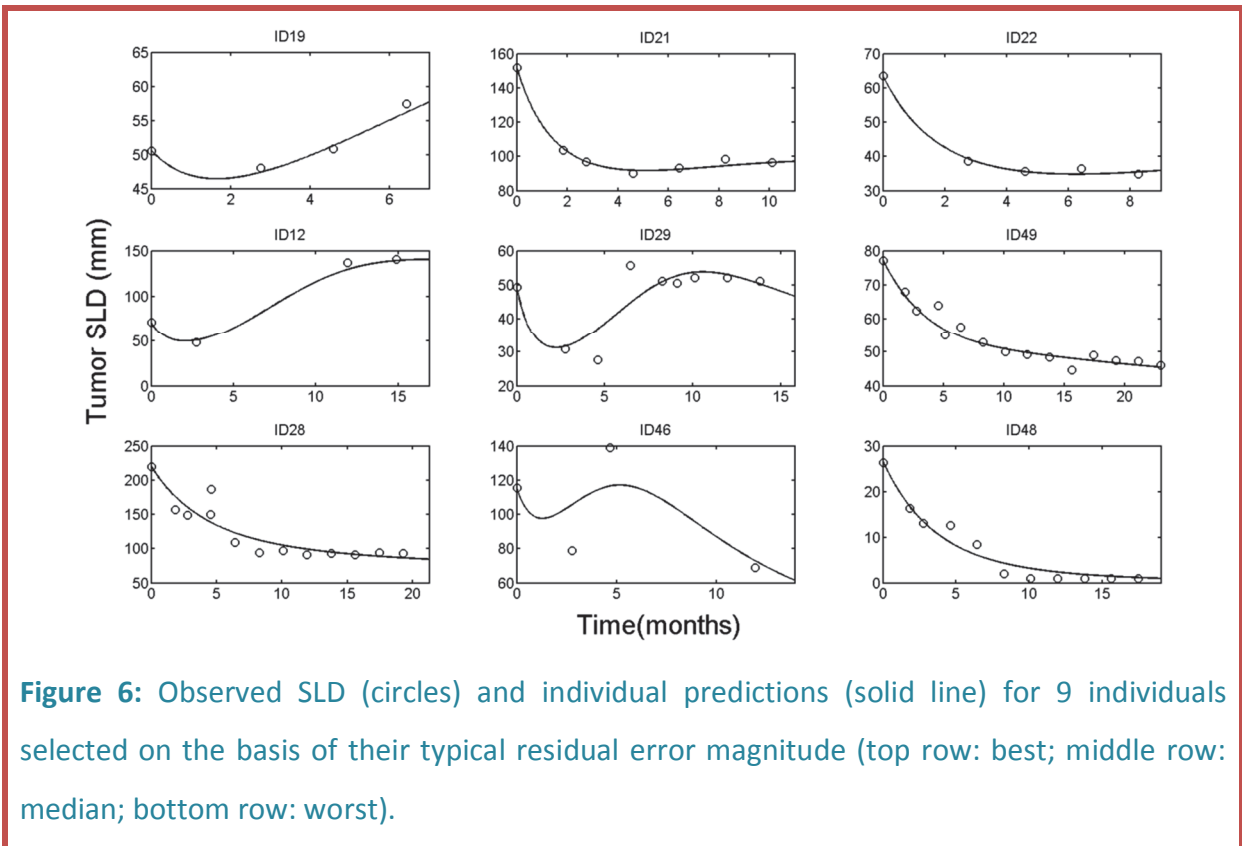
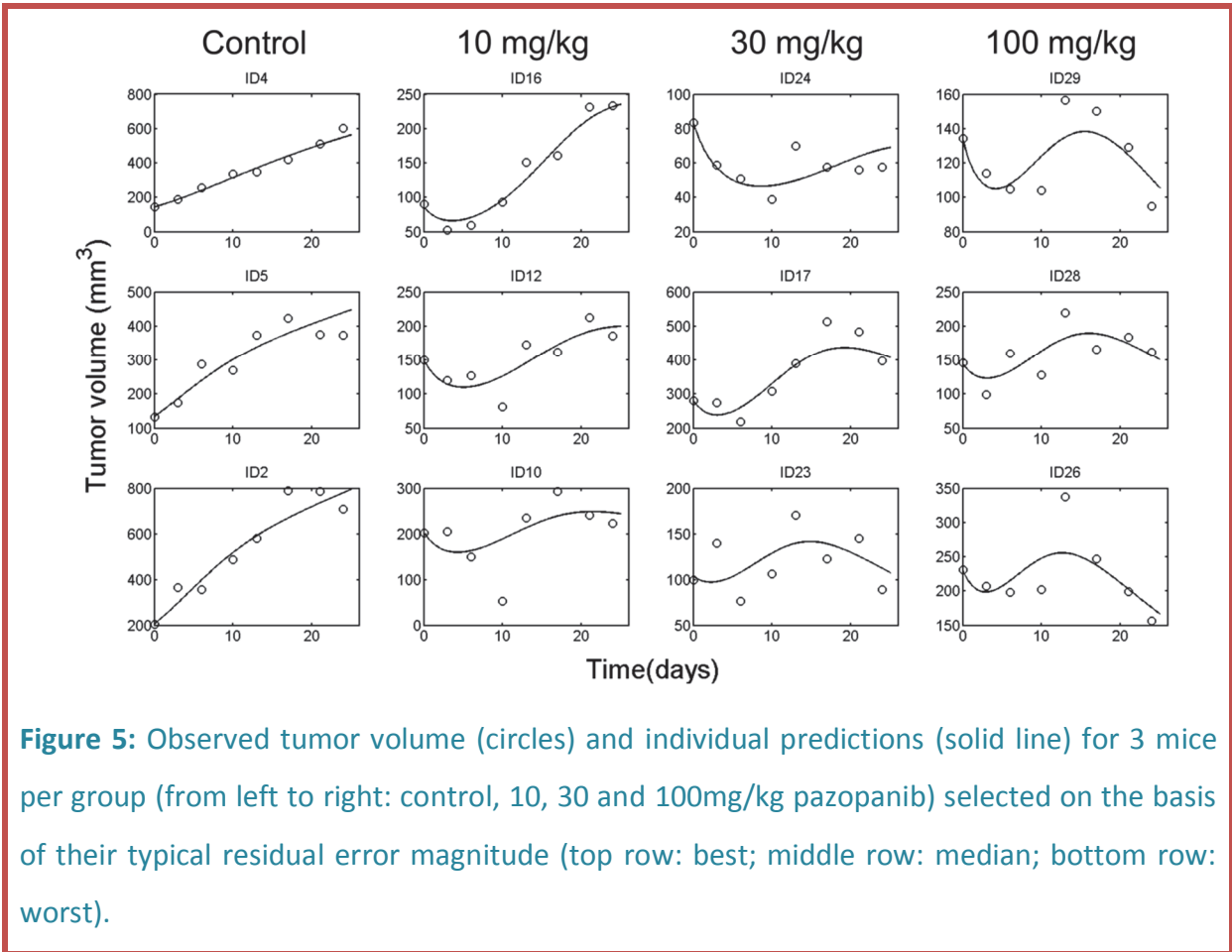
Individual plots were much better with our model as it could describe the initial and long-term tumor shrinkage due to pazopanib effects. Nevertheless, regarding BIC values, no significant improvement was observed between the dual effect model and the single cytotoxic effect model or the model described in <sup>8</sup> (supplementary table S1). The values of

the parameter estimated by the final model in both preclinical and clinical settings are summarized in Table 1.

Both studies have been analyzed separately as a simultaneous analysis did not improved parameter identifiability. Figure 5 shows individual data and their corresponding model's predictions for 3 mice per group (control, 10, 30 and 100 mg/kg pazopanib) selected according to their residual error values that are increasing from the first row to the third one. The same graphs for 9 patients are shown in figure 6.







## Discussion

Most models developed so far have been indifferently applied to cytotoxic and cytostatic drugs, including angiogenesis inhibitors such as pazopanib. Our model takes into account the role of tumor vasculature in tumor growth and shrinkage and therefore, is well suited to pazopanib as it is an angiogenesis inhibitor. The use of preclinical data, obtained through a rich experimental design (characterized by a high number of longitudinal observations, in addition to an accelerated course of disease), enabled us to build a simple mechanistic model that would probably not have been possible given clinical data alone. Figure 4 illustrates the typical dynamics of tumor size over time (the data shown are outcomes of a simulation using the population parameters reported in Table 1). The typical response to pazopanib in both humans and mice displays an unusual pattern: tumor burden decreases as soon as treatment starts. After some time, the tumor regrows before shrinking again. In light of the model's assumptions, the observed shape can be explained in the following terms: The initial decrease is due to a direct cytotoxic effect of the drug. Reducing vasculature could potentially translate into tumor shrinkage, but with a delay in time. This delay allows  $K$  to go below the tumor size variable and corresponds in reality to the time needed for the cells to respond to lack of oxygen supply. This delay is not observed in mice and patients. However, because of the resistance term, this effect disappears with time and, consequently, tumor size once again increases as disease progresses. This regrowth occurs until the antiangiogenic effect leads to a decrease in the carrying capacity ( $K$ ) below the tumor size ( $TS$ ) so that the tumor shrinks again. Simulations show that if the treatment is administered for a sufficiently long period of time, the tumor size ( $TS$ ) and the carrying capacity ( $K$ ) will decrease exponentially to reach a steady state. Interestingly, model simulations with typical

(population) parameter values produce this unusual shape in both mice and humans even if only 13% of the population presents these tumor size dynamics. In patients whose tumors followed such a pattern, the initial short decrease in tumor size and the subsequent, longer-term decrease appeared after about 3 and 17 months of treatment, respectively (see Figure 4). A large majority of patients, however, did not show this behavior. This may have been a result of the schedule of assessments (we note that dose interruptions were not reported for any of our analyzed patients). The model is still capable of reproducing the behavior, as the second decrease is observed among tumors whose initial carrying capacity  $K_0$  is relatively high, indicating high vascularization.

In mice, the level of pazopanib exposure had no impact on the cytotoxic effect ( $\beta_\alpha$  was initially estimated at 0.0002 then fixed to 0). However, the impact of exposure level on the antiangiogenic effect parameter was significant, meaning that, in mice, higher doses of pazopanib are associated with greater long-term tumor shrinkage, due to the destruction of the tumor vasculature. In humans, the impact of drug exposure on both antiangiogenic and cytotoxic efficacy was found to be significantly different from 0, although the range of exposure levels was narrow.

Our model, incorporating an indirect effect of the drug on the tumor size through inhibition of the vasculature, is based on plausible biological phenomena. Indeed, pazopanib's effect on tumor size is likely to be partially attributable to the drug's antiangiogenic action, as RCC is characterized by high tumor vascularization, due to the overexpression of pro-angiogenic factors by the cells displaying the mutation of the VHL gene. By inhibiting the pathways activated by VEGF and PDGF in endothelial cells, pazopanib could lead to a transient normalization of the blood vessels and subsequent destruction of the tumor vasculature,

thus depriving tumor cells of oxygen and nutrients needed for growth. The modeled cytotoxic effect is supported by several mechanisms documented in the literature. A cytotoxic effect may plausibly occur through pazopanib's effect on the VEGF pathway, a pathway known to promote proliferation and resistance to apoptosis<sup>33, 34</sup>. Pazopanib is also a potent inhibitor of the stem cell factor receptor c-KIT (IC50 = 0.074  $\mu\text{mol/L}$ . For comparison, IC50 = 0.010, 0.030 and 0.047  $\mu\text{mol/L}$  for VEGFR1, 2 and 3 respectively. IC50 = 0.071 and 0.084  $\mu\text{mol/L}$  for PDGFR- $\alpha$  and  $\beta$  respectively<sup>1</sup>.), which is responsible for the proliferation, differentiation, migration and survival of concerned cells<sup>35</sup>. Finally, emergence of resistance to the cytotoxic effect of pazopanib can be plausibly attributed to acquired polymorphisms and mutations of TKI receptors<sup>36</sup>.

Herein, by using preclinical tumor size time course information as input data in a model-building procedure, we were able to propose a new semi-mechanistic model of tumor size response to pazopanib in RCC patients. The model could describe the full unusual tumor dynamics in both mice and patients better than previously published tumor growth inhibition models. This preliminary work opens up many opportunities. In a future work it would be of interest to translate preclinical results into clinical predictions by using new scaling methods or allometry. To this end, we computed ratios between the preclinical and clinical rate parameter values (supplementary table S2). While these ratios do not provide exact matches to allometric ratios (e.g., unadjusted physiologic time ratio of 7.3 = (70 kg / 0.025 kg)<sup>0.25</sup> for drug half-life, or the maximum life-span potential ratio of about 30 between humans and mice), they show a rough correspondence in terms of order of magnitude<sup>37</sup>. More specifically, for a compound with a mechanism of action similar to that of pazopanib, an interesting avenue of research would be to compare clinical tumor

response to the response predicted by scaling the preclinical model parameters for the new compound with the rate ratios estimated for pazopanib. Another field of investigation concerns the improvement of the evaluation of clinical TKI efficacy. Indeed, our model is able to predict a long-term antiangiogenic effect following a tumor regrowth. Therefore it may be possible that some patients that dropped out due to PD, assessed through RECIST criteria, might have experienced a second tumor shrinkage thanks to the antiangiogenic effect of the pazopanib. This suggests that a longer follow-up and/or treatment could be beneficial to better assess efficacy in phase II. Actual data cannot support this statement that need to be investigated in a future work.

## Study Highlights

### **What is the current knowledge on the topic?**

Pazopanib is a tyrosine kinase inhibitor with multiple targets including angiogenesis. Existing pharmacokinetic-pharmacodynamic models are based on an empiric representation of tumor shrinkage due to treatment, and this representation does not specifically capture the compound's antiangiogenic action.

### **What question did this study address?**

The study focuses on the analysis of tumor size time course data from preclinical studies to lead to the development of a mechanistic model to predict pazopanib clinical efficacy.

### **What this study adds to our knowledge?**

Our analysis supports the use of complete tumor dynamics in mice to build an angiogenesis-dependent tumor growth model that describes the antiangiogenic effects of pazopanib in phase II patients. Our work concludes that both in mice and in humans, pazopanib exhibit a dual mechanism of action, and that the scaling of preclinical to clinical parameters shows a correspondence with allometric ratios that needs to be investigated in a future work.

### **How this might change clinical pharmacology and therapeutics?**

For a compound with a mechanism of action similar to that of pazopanib, an interesting avenue of research would be to compare clinical tumor response to the response predicted by scaling the preclinical model parameters for the new compound with the rate ratios estimated for pazopanib.

Our model suggests that PD might be identified prematurely as a potential long-term tumor shrinkage due to the antiangiogenic effect of pazopanib is likely to occur in some patients. If this statement is validated in future work, it will help to build new trial protocols in order to better assess efficacy.

## **Acknowledgements**

The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° 115156, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' contribution in kind. The DDMoRe project is also supported by financial contributions from academic and SME partners. This work does not necessarily represent the view of all DDMoRe partners.



## **Conflict of Interest**

D. Ouellet, H. Struemper and A.B. Suttle were employees of GlaxoSmithKline at the time of planning, analysis and publication development

## References

1. Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, Johnson JH, Crosby RM, Crouthamel MC, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Molecular cancer therapeutics* 2007, **6**(7): 2012-2021.
2. Garber K. Angiogenesis inhibitors suffer new setback. *Nature biotechnology* 2002, **20**(11): 1067-1068.
3. Kieran MW, Supko JG, Wallace D, Fruscio R, Poussaint TY, Phillips P, *et al.* Phase I study of SU5416, a small molecule inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) in refractory pediatric central nervous system tumors. *Pediatric blood & cancer* 2009, **52**(2): 169-176.
4. Bender BC, Schindler E, Friberg LE. Population pharmacokinetic pharmacodynamic modelling in oncology: a tool for predicting clinical response. *British journal of clinical pharmacology* 2013.
5. Claret L, Bruno R. Assessment of tumor growth inhibition metrics to predict overall survival. *Clin Pharmacol Ther* 2014, **96**(2): 135-137.
6. Maitland ML, Wu K, Sharma MR, Jin Y, Kang SP, Stadler WM, *et al.* Estimation of renal cell carcinoma treatment effects from disease progression modeling. *Clin Pharmacol Ther* 2013, **93**(4): 345-351.
7. Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2010, **66**(2): 357-371.
8. Claret L, Girard P, Hoff PM, Van Cutsem E, Zuideveld KP, Jorga K, *et al.* Model-based prediction of phase III overall survival in colorectal cancer on the basis of phase II tumor dynamics. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, **27**(25): 4103-4108.
9. Stein A, Wang W, Carter AA, Chiparus O, Hollaender N, Kim H, *et al.* Dynamic tumor modeling of the dose-response relationship for everolimus in metastatic renal cell carcinoma using data from the phase 3 RECORD-1 trial. *BMC cancer* 2012, **12**: 311.

10. Bonate PL, Suttle AB. Modeling tumor growth kinetics after treatment with pazopanib or placebo in patients with renal cell carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2013, **72**(1): 231-240.
11. Ribba B, Watkin E, Tod M, Girard P, Grenier E, You B, *et al.* A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *Eur J Cancer* 2011, **47**(3): 479-490.
12. Buil-Bruna N, Lopez-Picazo JM, Moreno-Jimenez M, Martin-Algarra S, Ribba B, Troconiz IF. A population pharmacodynamic model for lactate dehydrogenase and neuron specific enolase to predict tumor progression in small cell lung cancer patients. *The AAPS journal* 2014, **16**(3): 609-619.
13. Hansson EK, Amantea MA, Westwood P, Milligan PA, Houk BE, French J, *et al.* PKPD Modeling of VEGF, sVEGFR-2, sVEGFR-3, and sKIT as Predictors of Tumor Dynamics and Overall Survival Following Sunitinib Treatment in GIST. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 2013, **2**: e84.
14. Wilboux M, Henin E, Oza A, Colomban O, Pujade-Lauraine E, Freyer G, *et al.* Prediction of tumour response induced by chemotherapy using modelling of CA-125 kinetics in recurrent ovarian cancer patients. *British journal of cancer* 2014, **110**(6): 1517-1524.
15. Stroh M, Duda DG, Takimoto CH, Yamazaki S, Vicini P. Translation of anticancer efficacy from nonclinical models to the clinic. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 2014, **3**: e128.
16. Hutson TE, Davis ID, Machiels JP, De Souza PL, Rottey S, Hong BF, *et al.* Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010, **28**(3): 475-480.
17. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009, **45**(2): 228-247.
18. Lindstrom ML, Bates DM. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* 1990, **46**(3): 673-687.
19. Frances N, Claret L, Bruno R, Iliadis A. Tumor growth modeling from clinical trials reveals synergistic anticancer effect of the capecitabine and docetaxel combination in metastatic breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2011, **68**(6): 1413-1419.
20. Lobo ED, Balthasar JP. Pharmacodynamic modeling of chemotherapeutic effects: application of a transit compartment model to characterize methotrexate effects in vitro. *AAPS pharmSci* 2002, **4**(4): E42.

21. Ribba B, Kaloshi G, Peyre M, Ricard D, Calvez V, Tod M, *et al.* A tumor growth inhibition model for low-grade glioma treated with chemotherapy or radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012, **18**(18): 5071-5080.
22. Simeoni M, Magni P, Cammia C, De Nicolao G, Croci V, Pesenti E, *et al.* Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer research* 2004, **64**(3): 1094-1101.
23. Tham LS, Wang L, Soo RA, Lee SC, Lee HS, Yong WP, *et al.* A pharmacodynamic model for the time course of tumor shrinkage by gemcitabine + carboplatin in non-small cell lung cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, **14**(13): 4213-4218.
24. Ribba B, Holford NH, Magni P, Troconiz I, Gueorguieva I, Girard P, *et al.* A review of mixed-effects models of tumor growth and effects of anticancer drug treatment used in population analysis. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 2014, **3**: e113.
25. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *The AAPS journal* 2011, **13**(2): 143-151.
26. Finley DS, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. *The oncologist* 2011, **16 Suppl 2**: 4-13.
27. Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, Hlatky L. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer research* 1999, **59**(19): 4770-4775.
28. Goh BC, Reddy NJ, Dandamudi UB, Laubscher KH, Peckham T, Hodge JP, *et al.* An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified Cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010, **88**(5): 652-659.
29. Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S, Savage S, Suttle AB, Gibson DM, *et al.* Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(12): 4220-4227.
30. de Jonge MJ, Hamberg P, Verweij J, Savage S, Suttle AB, Hodge J, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of pazopanib and lapatinib combination therapy in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* 2013, **31**(3): 751-759.

31. Tan AR, Gibbon DG, Stein MN, Lindquist D, Edenfield JW, Martin JC, *et al.* Effects of ketoconazole and esomeprazole on the pharmacokinetics of pazopanib in patients with solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2013, **71**(6): 1635-1643.
32. Heath EI, Chiorean EG, Sweeney CJ, Hodge JP, Lager JJ, Forman K, *et al.* A phase I study of the pharmacokinetic and safety profiles of oral pazopanib with a high-fat or low-fat meal in patients with advanced solid tumors. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010, **88**(6): 818-823.
33. Epstein RJ. VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic. *Cancer metastasis reviews* 2007, **26**(3-4): 443-452.
34. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001, **98**(6): 1904-1913.
35. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 2009, **16**(5): 432-443.
36. Buczek M, Escudier B, Bartnik E, Szczylik C, Czarnecka A. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: from the patient's bed to molecular mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1845**(1): 31-41.
37. Mahmood I, Balian JD. The pharmacokinetic principles behind scaling from preclinical results to phase I protocols. *Clinical pharmacokinetics* 1999, **36**(1): 1-11.

## Supplementary material

Model	Preclinical analysis		Clinical analysis	
	BIC	$\Delta$ BIC	BIC	$\Delta$ BIC
<b>Final model</b>	2271	-	1415	-
<b>Effect on tumor size only</b>	2306	+36	1415	0
<b>Effect on carrying capacity only</b>	2321	+50	1510	+95
<b>Exponential</b>	2340	+69	1559	+144
<b>Logistic</b>	2315	+44	1442	+27
<b>Gompertz</b>	2317	+46	1451	+36
<b>Claret <i>et al</i> JCO 2009</b>	2350	+79	1409	-6
<b>Wang <i>et al</i> CPT 2009</b>	2536	+265	1439	+24
<b>Bonate and Suttle CCP 2013</b>	2357	+86	1445	+30
<b>Stein <i>et al</i> BMCC 2012</b>	2324	+53	1503	+88
<b>Simeoni <i>et al</i> CR 2004</b>	2299	+77	1583	+168

**Table S1:** Comparison of the Bayesian scores (BIC) of different model structures used for analyzing the tumor size time course in mice and patients.  $\Delta$ BIC denotes the difference in BIC with respect to the final model.

---

Parameters	Ratio preclinical/clinical
$\lambda$	80
$\gamma$	10
$\alpha$	35
$\delta$	13

---

**Table S2:** Ratios preclinical / clinical for parameters  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\gamma$ . For  $\alpha$  and  $\gamma$  parameters we assumed a fixed exposure level of 800  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  and used formulas (2) and (3) together with the parameter values reported in Table 1.

## Appendix I

### NONMEM input file for the preclinical analysis

```

$PROBLEM          ; Preclinical Final Model

$INPUT            ID DOSE TIME DV AUC VB

$DATA             NMCaki2.csv
                  IGNORE=@

$SUBROUTINES      ADVAN9 TOL=9

$MODEL            COMP = CELLS
                  COMP = CAPACITY

$PK

; ##### Parameters to be estimated #####

; Tumor growth parameters

; Growth rate constant: LAMBDA
      LAMBDA= THETA(1)*EXP(ETA(1))

; Initial tumor size:  V0
      V0     = VB*EXP(THETA(10)*ETA(2)) + THETA(11)*ETA(8)

; Carrying capacity parameters

; Initial carrying capacity:  K0
      K0     = THETA(3)*EXP(ETA(3))

; Angiogenesis growth rate: B
      KANG   = THETA(4)*EXP(ETA(4))

; Efficacy parameters

; Effect on the carrying capacity: GAMMA
      IF(DOSE.EQ.0) GAMMA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) GAMMA_I = THETA(5)*AUC**THETA(6)
      GAMMA   = GAMMA_I*EXP(ETA(5))

```



```

; Direct effect on tumor (cytotoxic effect): ALPHA

      IF(DOSE.EQ.0) ALPHA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) ALPHA_I = THETA(7)*AUC**THETA(8)
      ALPHA = ALPHA_I*EXP(ETA(6))

; Resistance on the cytotoxic effect: DELTA

      IF(DOSE.EQ.0) DELTA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) DELTA_I = THETA(9)
      DELTA = DELTA_I*EXP(ETA(7))

; ##### Initial conditions of the ODEs #####

      A_0(1)      = V0
      A_0(2)      = K0

$DES

; ##### Tumor dynamic model #####

; Tumor volume: A(1)

      DADT(1) = LAMBDA * A(1) * (1 - (A(1)/A(2))) - ALPHA*EXP(-
      DELTA*T) * A(1)

; Carrying capacity or angiogenesis process: A(2)

      DADT(2) = KANG * A(1) - GAMMA * A(2)

; ##### Renaming the different compartment #####

      A1      = A(1)
      A2      = A(2)

$ERROR (OBSERVATION ONLY)
IPRED = A(1)
W      = SQRT(THETA(10)*IPRED**2+THETA(11)**2)
Y = IPRED + W*EPS(1)
IRES = DV - IPRED
IWRES = IRES/W

```

\$THETA

```
(0, 0.144)      ; LAMBDA
0 FIX          ; V0
(0, 566)       ; K0
(0, 0.0159)    ; KANG
(0, 0.008)     ; GAMMA
(0, 0.295)     ; B_GAMMA
(0, 0.225)     ; ALPHA
0 FIX         ; B_ALPHA
(0, 0.214)     ; DELTA
(0, 0.023)     ; ERR1_prop
(0, 10)        ; ERR2_ADD
```

\$OMEGA

```
0.273          ; OM_LAMBDA
1 FIX          ; OM_V0 (prop error)
0.127          ; OM_K0
0 FIX         ; OM_KANG
0.0418         ; OM_GAMMA
0.0506         ; OM_ALPHA
0.167          ; OM_DELTA
1 FIX         ; OM_V0 (add error)
```

\$SIGMA

```
1 FIX          ;EPS1 set to 1
```

```
$ESTIMATION MAXEVAL=9999 PRINT=1 NOABORT METHOD=1 INTERACTION
```

```
$COVARIANCE PRINT=E
```

## Appendix II

### NONMEM input file for the clinical analysis

```

$PROBLEM          ; Clinical Final Model

$INPUT            ID DOSE TIME DV BASE AUC

$DATA             Clinical_data.csv
                  IGNORE=@

$SUBROUTINES      ADVAN9 TOL=9

$MODEL            COMP = CELLS
                  COMP = CAPACITY

$PK

; ##### Parameters to be estimated #####

; Tumor growth parameters
      ; Growth rate constant: LAMBDA
      LAMBDA= THETA(1)*EXP(ETA(1))

      ; Initial tumor size:  V0
      V0      = VB*EXP(THETA(10)*ETA(2)) + THETA(11)*ETA(8)

; Carrying capacity parameters
      ; Initial carrying capacity:  K0
      K0      = THETA(3)*EXP(ETA(3))

      ; Angiogenesis growth rate: B
      KANG    = THETA(4)*EXP(ETA(4))

; Efficacy parameters
      ; Effect on the carrying capacity: GAMMA
      IF(DOSE.EQ.0) GAMMA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) GAMMA_I = THETA(5)*AUC**THETA(6)
      GAMMA    = GAMMA_I*EXP(ETA(5))

```

```

; Direct effect on tumor (cytotoxic effect): ALPHA

      IF(DOSE.EQ.0) ALPHA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) ALPHA_I = THETA(7)*AUC**THETA(8)
      ALPHA = ALPHA_I*EXP(ETA(6))

; Resistance on the cytotoxic effect: DELTA

      IF(DOSE.EQ.0) DELTA_I = 0
      IF(DOSE.GT.0) DELTA_I = THETA(9)
      DELTA = DELTA_I*EXP(ETA(7))

; ##### Initial conditions of the ODEs #####

      A_0(1)      = V0
      A_0(2)      = K0

$DES

; ##### Tumor dynamic model #####

; Tumor volume: A(1)

      DADT(1) = LAMBDA * A(1) * (1 - (A(1)/A(2))) - ALPHA*EXP(-
      DELTA*T) * A(1)

; Carrying capacity or angiogenesis process: A(2)

      DADT(2) = KANG * A(1)**0.5 - GAMMA * A(2)

; ##### Renaming the different compartment #####

      A1      = A(1)
      A2      = A(2)

$ERROR (OBSERVATION ONLY)
IPRED = A(1)
W      = SQRT(THETA(10)*IPRED**2+THETA(11)**2)
Y = IPRED + W*EPS(1)
IRES = DV - IPRED
IWRES = IRES/W

$THETA

```

```
(0, 0.0015) ; LAMBDA
0 FIX      ; V0
(0, 1490)  ; K0
(0, 0.0043) ; KANG
(0, 0.001) ; GAMMA
(0, 0.356) ; B_GAMMA
(0, 0.0056) ; ALPHA
(0, 0.0391) ; B_ALPHA
(0, 0.0214) ; DELTA
(0, 0.008) ; ERR1_prop
(0, 2)     ; ERR2_ADD

$OMEGA

0.1        ; OM_LAMBDA
1 FIX      ; OM_V0 (prop error)
0 FIX      ; OM_K0
0 FIX      ; OM_KANG
0.56       ; OM_GAMMA
0.23       ; OM_ALPHA
0.32       ; OM_DELTA
1 FIX      ; OM_V0 (add error)

$SIGMA

1 FIX      ;EPS1 set to 1

$ESTIMATION MAXEVAL=9999 PRINT=1 NOABORT METHOD=1 INTERACTION

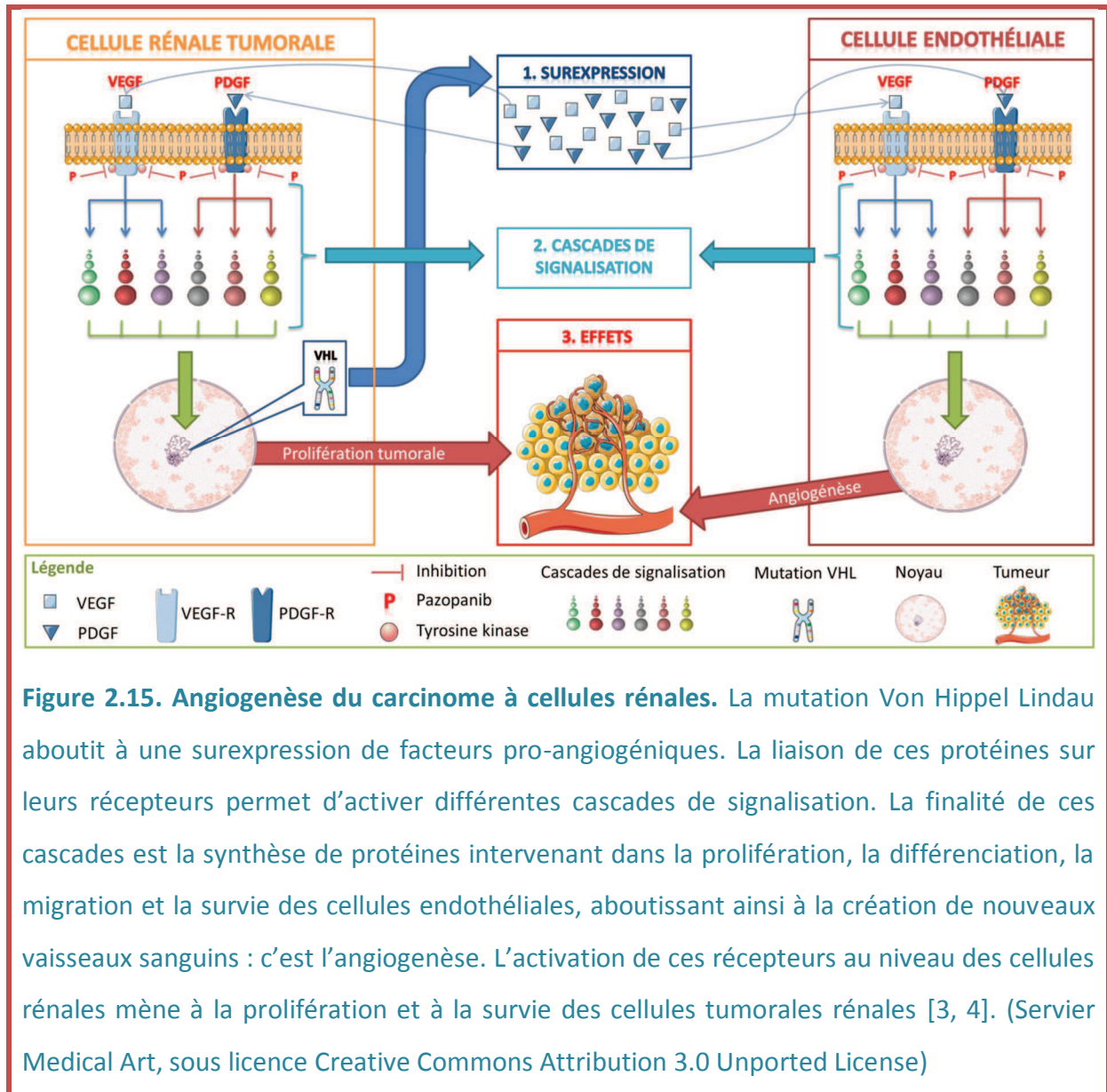
$COVARIANCE PRINT=E
```

## II- Complément d'article

### A. Contexte général

#### 1. Le carcinome à cellules rénales

Le carcinome à cellules rénales est une tumeur maligne qui naît au niveau de la région corticale du rein. La maladie possède une incidence et une mortalité très variables en fonction de la situation géographique et du sexe, même si globalement les hommes sont plus touchés que les femmes [1]. 60 à 80% des carcinomes rénaux présentent une mutation du gène VHL, un suppresseur de tumeur qui code pour la protéine VHL [2]. Chez des cellules saines en *normoxie*, cette protéine mène à la dégradation de la protéine HIF-1 $\alpha$ . En conditions hypoxiques, la protéine HIF-1 $\alpha$  est surexprimée et la balance entre la synthèse et la dégradation de la protéine penche en faveur de sa synthèse. HIF-1 $\alpha$  peut alors activer de nombreux facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF ou le PDGF ainsi que leurs récepteurs, dont la finalité est la synthèse de nouveaux vaisseaux permettant de rétablir la *normoxie* tissulaire. La mutation du gène VHL mène à une perte de fonction de la protéine VHL. Ainsi, la protéine HIF-1 $\alpha$  s'accumule et la synthèse de facteurs pro-angiogéniques devient continue. Il en résulte une *angiogenèse* incontrôlée donnant lieu à un réseau vasculaire anarchique au sein de la tumeur. La figure 2.1 illustre bien l'*angiogenèse* tumorale propre au carcinome à cellules rénales.



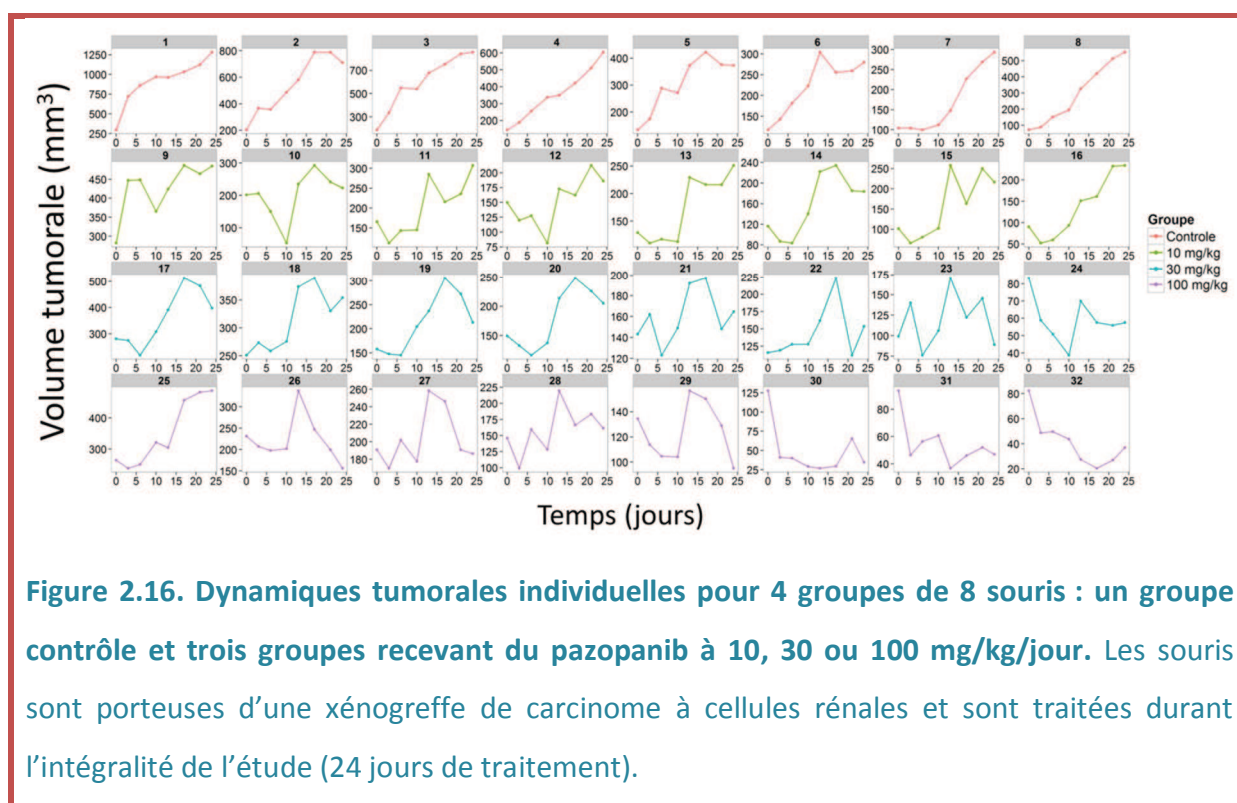
## 2. Le pazopanib

Le pazopanib est un inhibiteur de tyrosine kinase multi-cible approuvé pour le traitement du cancer du rein métastatique. Ses cibles principales sont les récepteurs 1, 2 et 3 du VEGF, les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  du PDGF et le récepteur c-KIT [5]. Par conséquent, en agissant sur différentes cibles pro-angiogéniques, le pazopanib inhibe efficacement l'*angiogenèse*. On comprend mieux l'intérêt d'une telle molécule pour le traitement du carcinome à cellules

rénales puisque l'on a vu précédemment que ces tumeurs sur-expriment bon nombre de facteurs pro-angiogéniques. Cependant, du fait de ses multiples cibles, le mécanisme d'action du pazopanib reste assez flou.

### 3. Dynamique tumorale sous pazopanib

Les figures 2.2 et 2.3 montrent respectivement les dynamiques tumorales observées chez des souris et chez des patients.

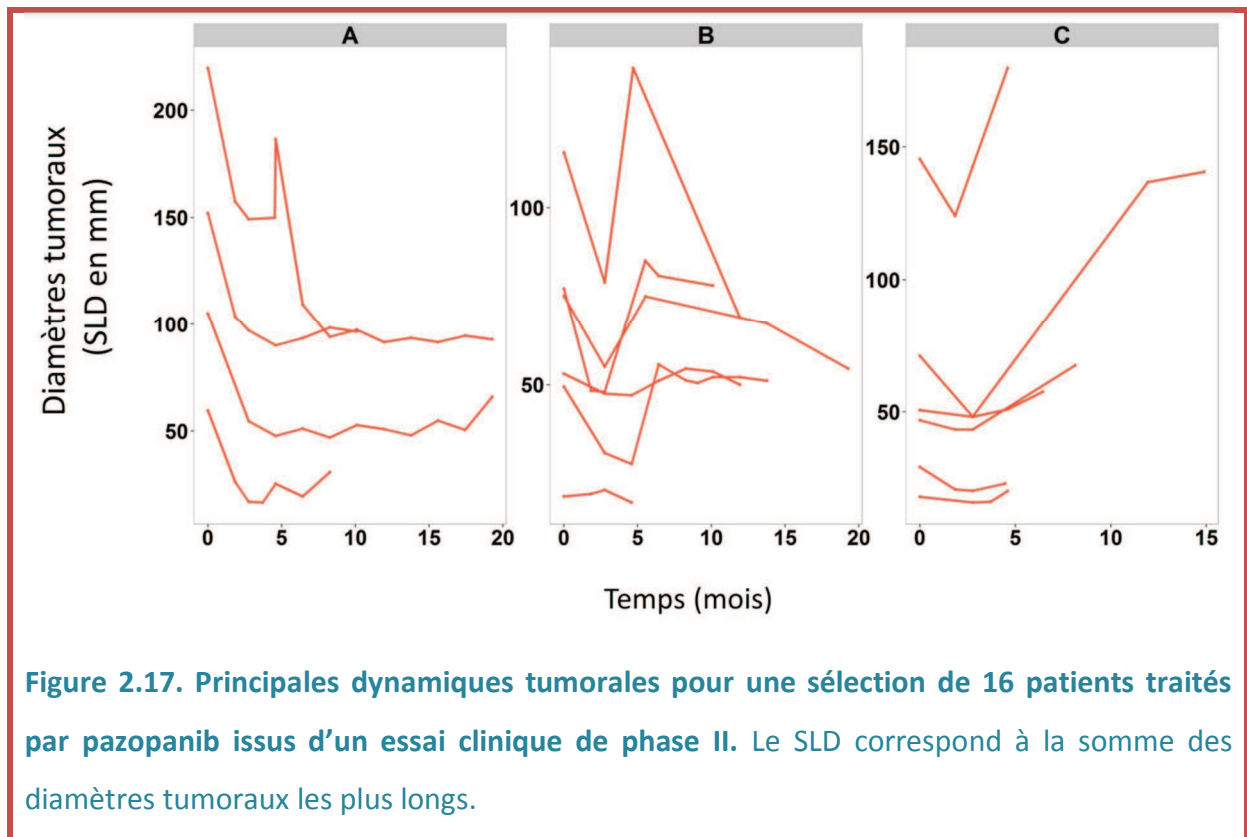


**Figure 2.16. Dynamiques tumorales individuelles pour 4 groupes de 8 souris : un groupe contrôle et trois groupes recevant du pazopanib à 10, 30 ou 100 mg/kg/jour. Les souris sont porteuses d'une xénogreffe de carcinome à cellules rénales et sont traitées durant l'intégralité de l'étude (24 jours de traitement).**

La majorité des tumeurs du groupe contrôle (figure 2.2, première ligne) ne font que croître, tandis que certaines tendent à se stabiliser. Lorsque les souris sont traitées par pazopanib, la dynamique tumorale adopte une allure assez particulière. En effet, nous pouvons observer que dès lors que le pazopanib est administré, la tumeur rétrécit une première fois avant de



recroître puis rétrécir de nouveau. Nous remarquerons aussi que ces trois phases sont plus ou moins bien observées en fonction de la dose de pazopanib reçue.



La figure 2.3 illustre les trois principales dynamiques tumorales que l'on observe chez des patients traités quotidiennement par 800 mg de pazopanib. Pour les patients du groupe A, le traitement réduit efficacement la tumeur jusqu'à un plateau. Parfois, une légère recroissance est observée chez ces mêmes patients. Pour les patients du groupe B, nous remarquons une allure non-monotone semblable à celle observée chez les souris. Dans le groupe C, la tumeur recroît après avoir rétréci une première fois.

Ainsi, nous pouvons nous demander si ces fluctuations de la dynamique tumorale sont liées à des variations de mesures ou bien à des effets propres au pazopanib. Le fait d'observer des fluctuations d'aspects similaires, et qui plus est uniquement chez les individus traités (figure 2.2), peut nous laisser penser que le pazopanib est le principal

responsable. Si c'est bien le cas, nous pouvons aussi nous demander si les effets du pazopanib observés chez la souris sont les mêmes chez l'homme.

#### 4. Challenges du développement du pazopanib

La transition préclinique/clinique est une étape complexe et délicate lors du développement d'un médicament. Le pazopanib ne déroge pas à cette règle. Nous avons vu précédemment que du fait de ses multiples cibles, le mécanisme d'action de la molécule n'est pas totalement clair. L'allure particulière des dynamiques tumorales que l'on observe chez l'homme et l'animal témoigne de la complexité des effets du pazopanib sur le carcinome à cellules rénales. L'analyse des données précliniques grâce à un modèle semi-mécanistique à effets-mixtes, peut nous aider à mieux décrire ces dynamiques tumorales particulières, en se basant sur des hypothèses concernant le(s) mécanisme(s) d'action du pazopanib. En effet, il est tout à fait possible de tester différentes actions du pazopanib, sur l'angiogenèse ou la croissance tumorale par exemple, et de comparer les modèles entre eux pour sélectionner celui qui répondra le mieux aux différents critères diagnostics (présentés en annexe). A partir d'un modèle mathématique adapté, il est alors possible de réaliser différentes simulations (nouvelles doses, autres intervalles de prises, prédictions individuelles, etc.) qui vont permettre de faciliter le développement de la molécule. Le "design" des études précliniques, qui permet de disposer de dynamiques tumorales complètes grâce à des données riches, est parfaitement adapté pour ce type d'analyse. Malheureusement l'utilisation régulière des techniques d'imagerie constitue un obstacle important pour évaluer l'évolution de la maladie chez l'homme. Toutes ces contraintes rendent bien plus difficile l'obtention de données tumorales riches chez l'homme. Cela

explique pourquoi les données dont nous disposons sont peu nombreuses par rapport aux données obtenues lors des expériences précliniques (la médiane du nombre d'observations par patient est de 4 alors que c'est le double chez les souris) ; et donc plus laborieuses à exploiter pour développer un modèle semi-mécanistique.

Par conséquent, toute information complémentaire permettant de faciliter la modélisation des données cliniques peut être utile. De ce fait une nouvelle question intéressante se pose : peut-on se servir des données riches des études précliniques pour décrire les dynamiques tumorales chez l'homme issues de données peu nombreuses ?

## B. Objectifs

L'objectif principal de cette étude est de faciliter l'analyse de données cliniques grâce à l'utilisation de dynamiques tumorales complètes issues des études précliniques. Pour cela, nous envisageons dans un premier temps de développer un modèle permettant de comprendre le mode d'action du pazopanib et de décrire de façon adéquate la dynamique des carcinomes à cellules rénales chez les souris exclusivement. Dans un second temps, le modèle final issu de l'analyse préclinique sera utilisé avec les données cliniques dans le but d'obtenir une description détaillée des effets du pazopanib chez les patients.

## C. Démarche de construction du modèle

Dans cette partie nous allons nous concentrer sur le raisonnement que nous avons suivi pour arriver au *modèle* final. Il s'agit avant tout de proposer une démarche de modélisation basée sur les données dont nous disposons et les mécanismes d'action du médicament et de la maladie.

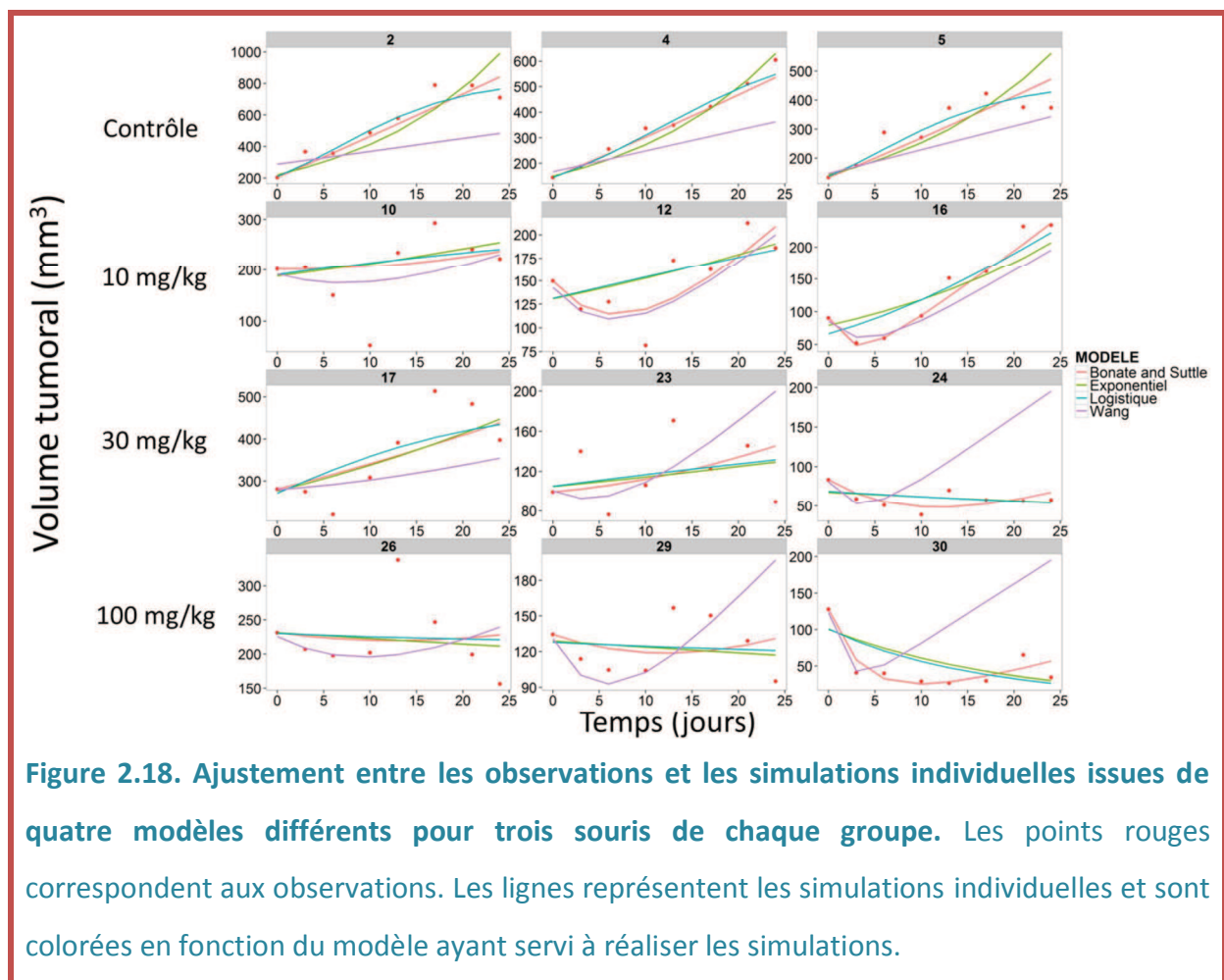
### 1. Données disponibles

Nous possédons quatre groupes de huit souris porteuses d'une xénogreffe de carcinome à cellules rénales. Les groupes sont définis par la dose de pazopanib reçue : placebo (groupe contrôle), 10, 30 ou 100 mg/kg/jour. Le traitement est administré par voie orale pendant 24 jours. Nous disposons au final de huit observations par souris pour chaque groupe (volumes tumoraux en mm<sup>3</sup>). La figure 2.2 montre les dynamiques tumorales individuelles.

En ce qui concerne les données cliniques, nous avons à disposition un échantillon de 47 patients issus d'un essai clinique de phase II [6]. Tous les patients sont porteurs d'un carcinome à cellules rénales de stade avancé ou métastasé. Le pazopanib est administré quotidiennement à une dose de 800 mg par voie orale pouvant être réduite en cas d'intolérance. L'évolution de la taille tumorale est évaluée grâce à la somme des diamètres tumoraux les plus longs ou SLD (sum of longest tumor diameters) obtenus par imagerie médicale (SLD en mm). Le traitement est arrêté en cas d'effets indésirables sévères ou d'une progression de la maladie évaluée selon les critères RECIST 1.1 [7]. Ainsi, toute augmentation de la SLD d'au moins 20% par rapport à la plus petite SLD mesurée est considérée comme

une progression de la maladie. La figure 2.3 montre les principales dynamiques tumorales que l'on observe au sein de l'échantillon pour une sélection de 16 patients. Le groupe C de la figure 2.3 sont des patients ayant progressés sous pazopanib.

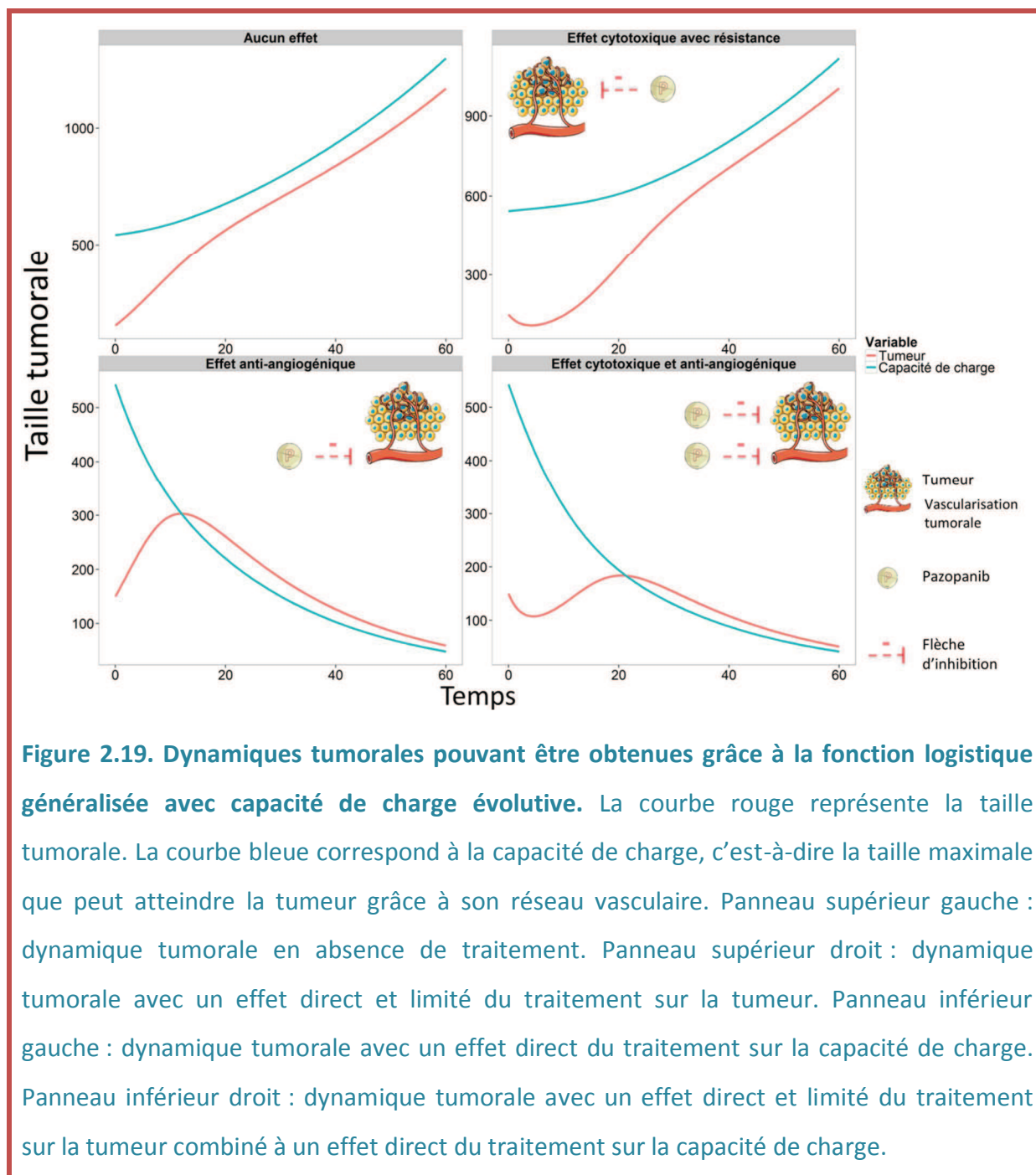
## 2. Analyse préclinique



Dans un premier temps, nous avons décidé de commencer par analyser les quatre groupes de souris avec différents modèles empiriques que nous avons décrits dans le chapitre 1 section II.C.1. La figure 2.4 montre la qualité de la prédiction de la dynamique tumorale chez trois souris de chaque groupe pour une sélection de quatre modèles de complexité différente. Comme l'illustrent les courbes d'ajustement (figure 2.4), aucun des

modèles empiriques que nous avons testés n'a pu capturer correctement l'allure de la dynamique tumorale sous pazopanib. Les modèles trop simples, comme la fonction exponentielle ou la fonction logistique, peinent à décrire la moindre décroissance et ne donnent que des prédictions grossières qui passent entre ces observations. Des modèles plus complexes comme celui développé par Bonate et Suttle en 2013 [8] parviennent à capturer la première décroissance mais pas la seconde. A la vue de l'allure des dynamiques tumorales, il paraît évident que ces types de modèles empiriques ne sont pas adaptés pour analyser ce type de dynamique. En effet ils sont majoritairement utilisés lorsqu'on observe une décroissance tumorale unique en réponse à l'administration d'un traitement, ce qui n'est pas le cas ici.

C'est pourquoi dans un second temps nous avons décidé de réfléchir sur les mécanismes d'actions potentiels du pazopanib qui permettraient d'expliquer l'allure des dynamiques tumorales observées. Nous savons que le pazopanib inhibe l'angiogenèse en agissant au niveau des tyrosines kinases des récepteurs de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (figure 2.1). La fonction logistique généralisée avec capacité de charge évolutive est un bon candidat pour décrire les données précliniques (voir Chapitre 1, section II.C.2). Pour rappel, ce modèle décrit la croissance tumorale selon une fonction logistique dont le plateau n'est pas fixe, mais à l'inverse ajustable continuellement en fonction de la variable observée. L'analogie avec l'angiogenèse tumorale vient du fait que la tumeur continue sa croissance grâce à l'apport de nutriment et d'oxygène provenant de sa néo-vascularisation au lieu de se stabiliser à un plateau.



Divers profils tumoraux obtenus à l'aide de la fonction de croissance logistique générale avec capacité de charge évolutive sont représentés sur la figure 2.5. La ligne rouge représente la taille de la tumeur dont les cellules sont en *hypoxie* (du fait de la mutation VHL, cf. figure 2.1), et la ligne bleue la taille maximale que peut atteindre la tumeur étant donné son réseau vasculaire dont le développement est dépendant de la quantité de cellules en *hypoxie*. Dans

le cas du carcinome à cellules rénales, on considère que toutes les cellules tumorales viables sont hypoxiques du fait de la mutation VHL. Plus la tumeur grossira, plus son réseau vasculaire augmentera. L'intérêt du modèle réside dans les différentes cibles d'action sur lesquelles le traitement peut interagir. Il devient alors possible de modéliser différents effets du pazopanib sur le carcinome à cellules rénales comme par exemple un effet anti-angiogénique, mais aussi un effet cytotoxique ou même les deux en même temps (équation 1).

$$\frac{dTS}{dt} = \lambda \cdot TS \cdot \left[ 1 - \left( \frac{TS}{K} \right) \right] - \alpha \cdot TS \cdot e^{-\delta \cdot t}$$

$$\frac{dK}{dt} = k_{ang} \cdot TS - \gamma \cdot K$$

(1)

$$TS_{(t=0)} = TS_0$$

$$K_{(t=0)} = K_0$$

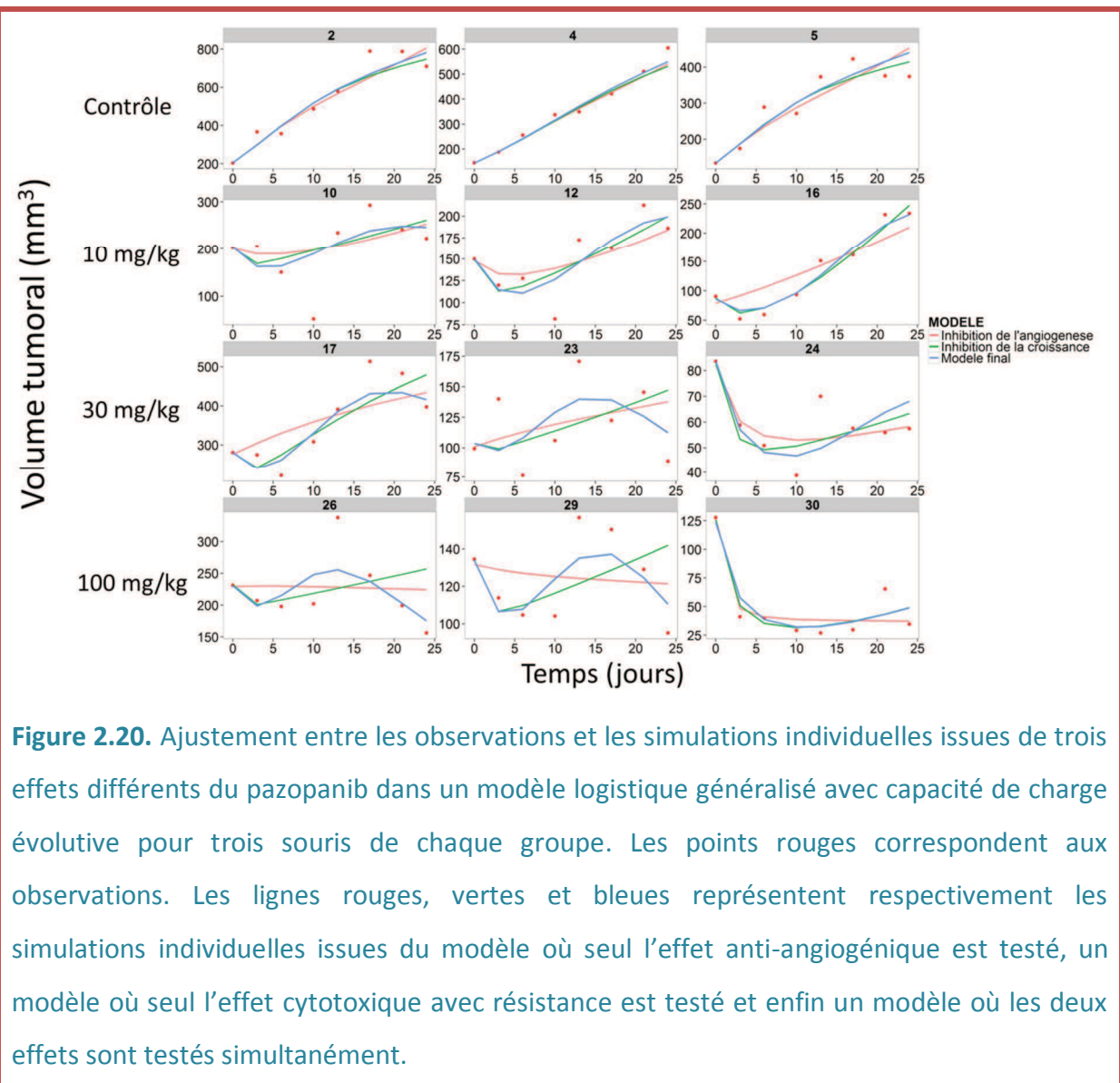
Où  $TS$  est le volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ),  $K$  la capacité de charge ( $\text{mm}^3$ ),  $\lambda$  la constante de croissance tumorale ( $\text{jour}^{-1}$ ),  $\alpha$  la constante d'efficacité cytotoxique du pazopanib ( $\text{jour}^{-1}$ ),  $\gamma$  la constante d'efficacité anti-angiogénique du pazopanib ( $\text{jour}^{-1}$ ),  $\delta$  la constante de résistance à l'effet cytotoxique ( $\text{jour}^{-1}$ ) et  $k_{ang}$  la constante de vitesse de vascularisation de la tumeur ( $\text{jour}^{-1}$ ).  $TS_0$  et  $K_0$  représentent respectivement la taille tumorale initiale et la capacité de charge initiale. Comme nous ne disposons que de la dose et de l'exposition au traitement de la dose correspondante (AUC), nous ne pouvons simuler des concentrations de pazopanib à l'aide d'un modèle PK classique pour modéliser l'effet du traitement. De ce fait, l'AUC est inclus dans le modèle au niveau des paramètres d'effets  $\alpha$  et  $\gamma$  sous la forme d'une covariable continue selon le modèle suivant :



$$\alpha = \alpha_0 \cdot AUC^{\beta_\alpha} \quad (2)$$

$$\gamma = \gamma_0 \cdot AUC^{\beta_\gamma} \quad (3)$$

$\alpha_0$  et  $\gamma_0$  représentent la valeur “basale” de population pour les paramètres  $\alpha$  et  $\gamma$ ; et  $\beta_\alpha$  et  $\beta_\gamma$  sont les deux paramètres du modèle de covariable devant être estimés.



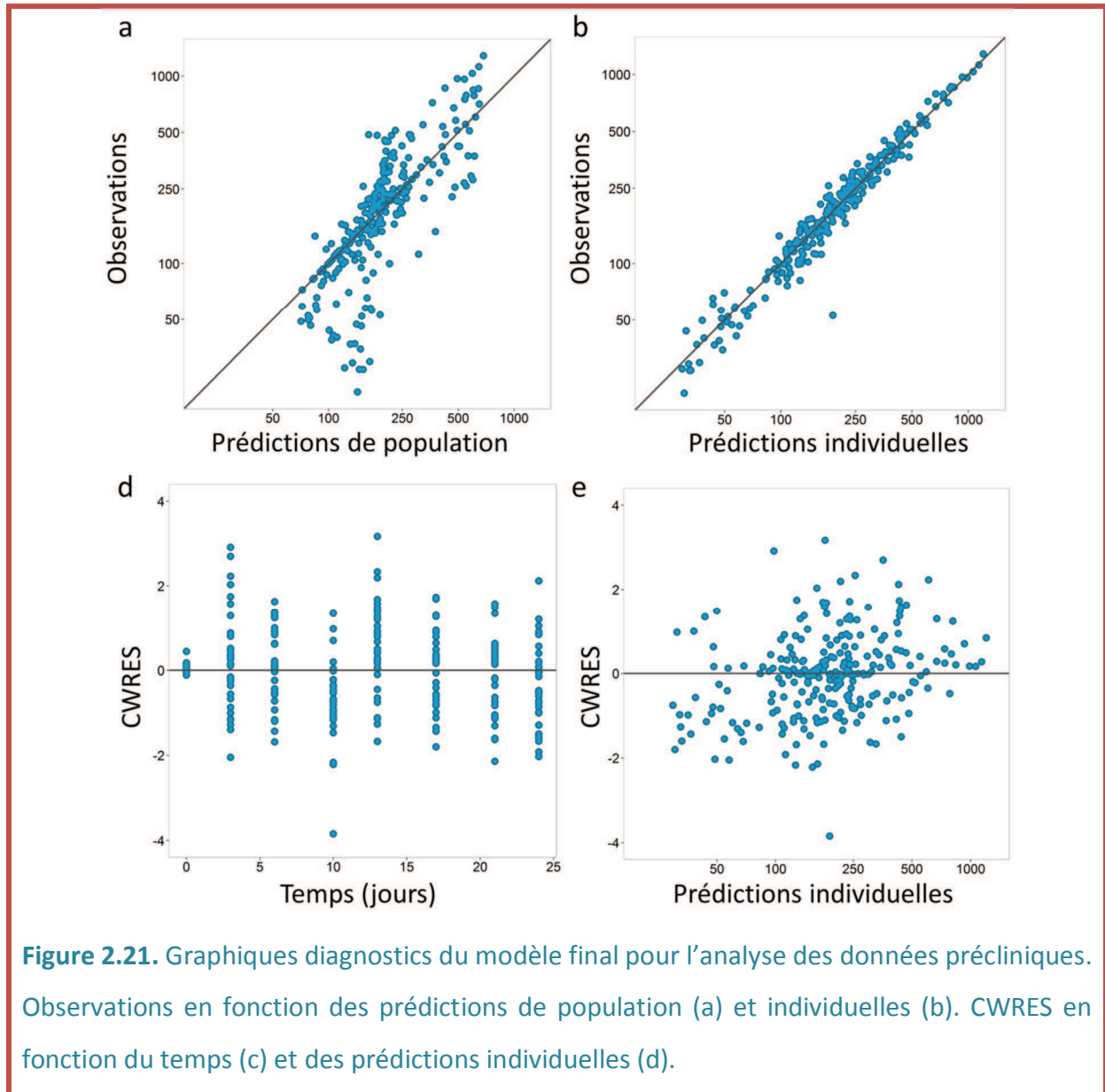
La figure 2.6 montre les prédictions que nous avons réalisées grâce au modèle logistique avec capacité de charge évolutive sur les données précliniques. Nous avons pu tester trois

effets de la molécule comme expliqué précédemment. La courbe rouge de la figure 2.6 montre les simulations individuelles pour le modèle où le pazopanib exerce uniquement un effet anti-angiogénique (équation 1 sans la partie bleue). Ce modèle n'est pas capable de capturer la dynamique tumorale complète sous pazopanib, en particulier la première phase de décroissance observée dès le début du traitement. Cela paraît logique puisqu'il faut un certain temps avant que le réseau vasculaire ne se dégrade et par la même occasion réduise la taille tumorale (figure 2.5, panneau inférieur gauche). Par conséquent, plutôt que le résultat d'un effet anti-angiogénique, nous pensons que cette première réduction tumorale pourrait être le fruit d'un effet immédiat sur les cellules ; un effet cytotoxique qui s'estomperait rapidement puisque la tumeur recroît. La courbe verte de la figure 2.6 montre que le modèle avec un effet cytotoxique seul permet de mieux décrire la première décroissance (équation 1 sans la partie rouge). Cependant il ne parvient pas à capturer la seconde décroissance. La dernière option qui s'offre à nous est celle où le pazopanib exerce à la fois un effet anti-angiogénique et un effet cytotoxique bref (équation 1 complète). Ce modèle final parvient à capturer correctement l'ensemble de la dynamique tumorale chez les souris (courbe bleue figure 2.6).

Le tableau 2.1 récapitule les valeurs du critère BIC pour l'ensemble des modèles testés. Le modèle final comprenant un double effet du pazopanib (effet cytotoxique court et effet anti-angiogénique continu) est celui qui permet de mieux décrire la dynamique particulière des carcinomes à cellules rénales traités par pazopanib (figure 2.6). Il possède par ailleurs les meilleurs graphiques diagnostics (figure 2.7), la fonction objective (BIC) la plus basse (tableau 2.1) et des paramètres assez correctement estimés (tableau 2.3).

Modèle	Analyse préclinique	
	BIC	$\Delta$ BIC
Modèle final	2271	-
Effet sur la taille tumorale seulement	2306	+36
Logistique	2315	+44
Gompertz	2317	+46
Effet sur la capacité de charge seulement	2321	+50
Stein <i>et al</i> BMCC 2012	2324	+53
Exponentiel	2340	+69
Simeoni <i>et al.</i> CR 2004	2299	+77
Claret <i>et al.</i> JCO 2009	2350	+79
Bonate et Suttle CCP 2013	2357	+86
Wang <i>et al.</i> CPT 2009	2536	+265

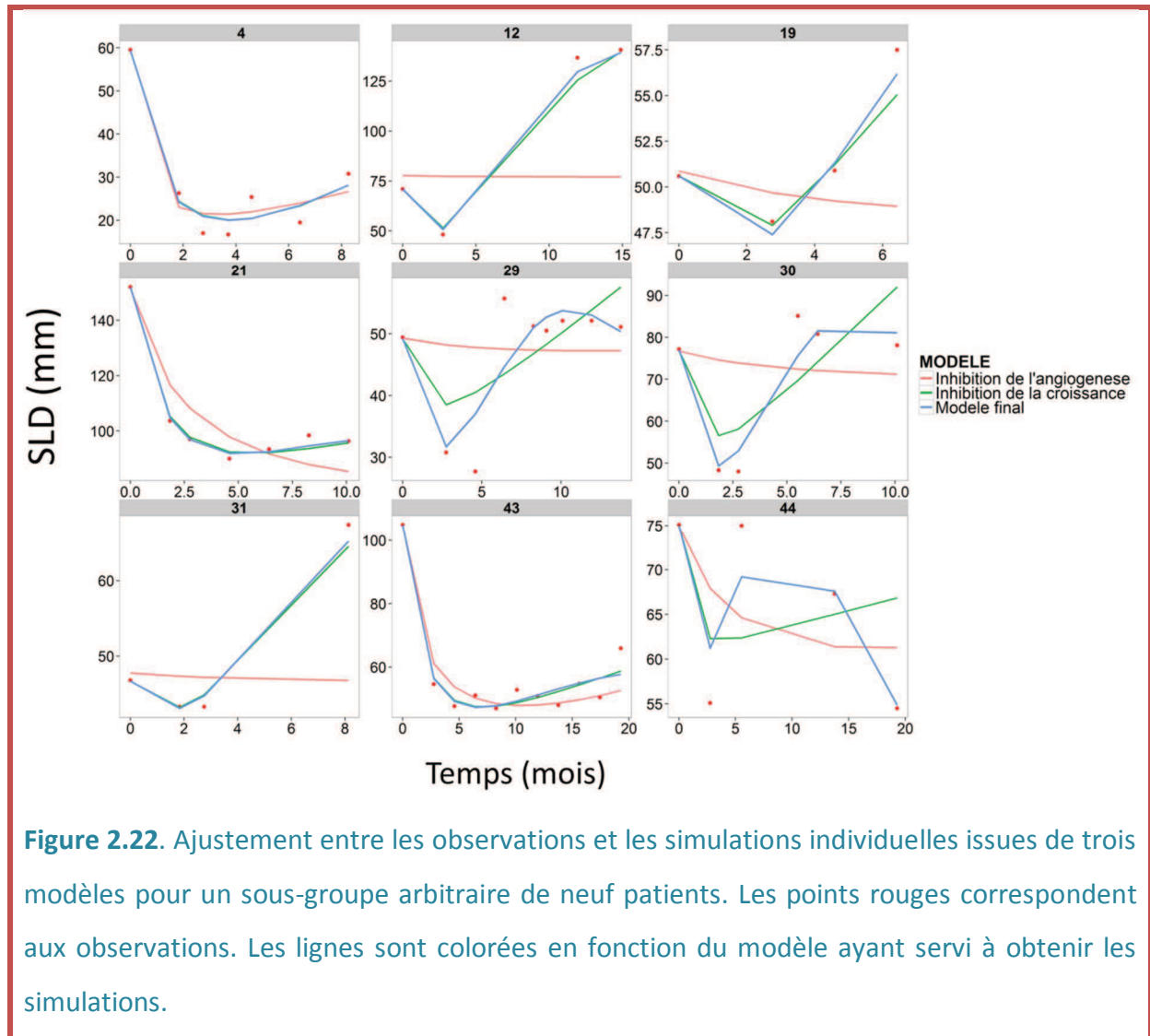
**Tableau 2.1. Résultats du critère BIC pour le "screening" de modèles sur les données précliniques.**  $\Delta$ BIC est la différence entre le BIC d'un modèle et celui du modèle de référence (modèle final). Les  $\Delta$ BIC sont classés par ordre croissant.



**Figure 2.21.** Graphiques diagnostics du modèle final pour l'analyse des données précliniques. Observations en fonction des prédictions de population (a) et individuelles (b). CWRES en fonction du temps (c) et des prédictions individuelles (d).

### 3. Analyse clinique

Le modèle final que nous avons développé à partir des données précliniques a été réutilisé pour analyser les données cliniques. La figure 2.8 nous montre que le modèle final (ligne bleue), où le pazopanib agit à la fois sur la tumeur et sa vascularisation, est tout à fait capable de décrire les dynamiques tumorales que l'on observe chez les patients.

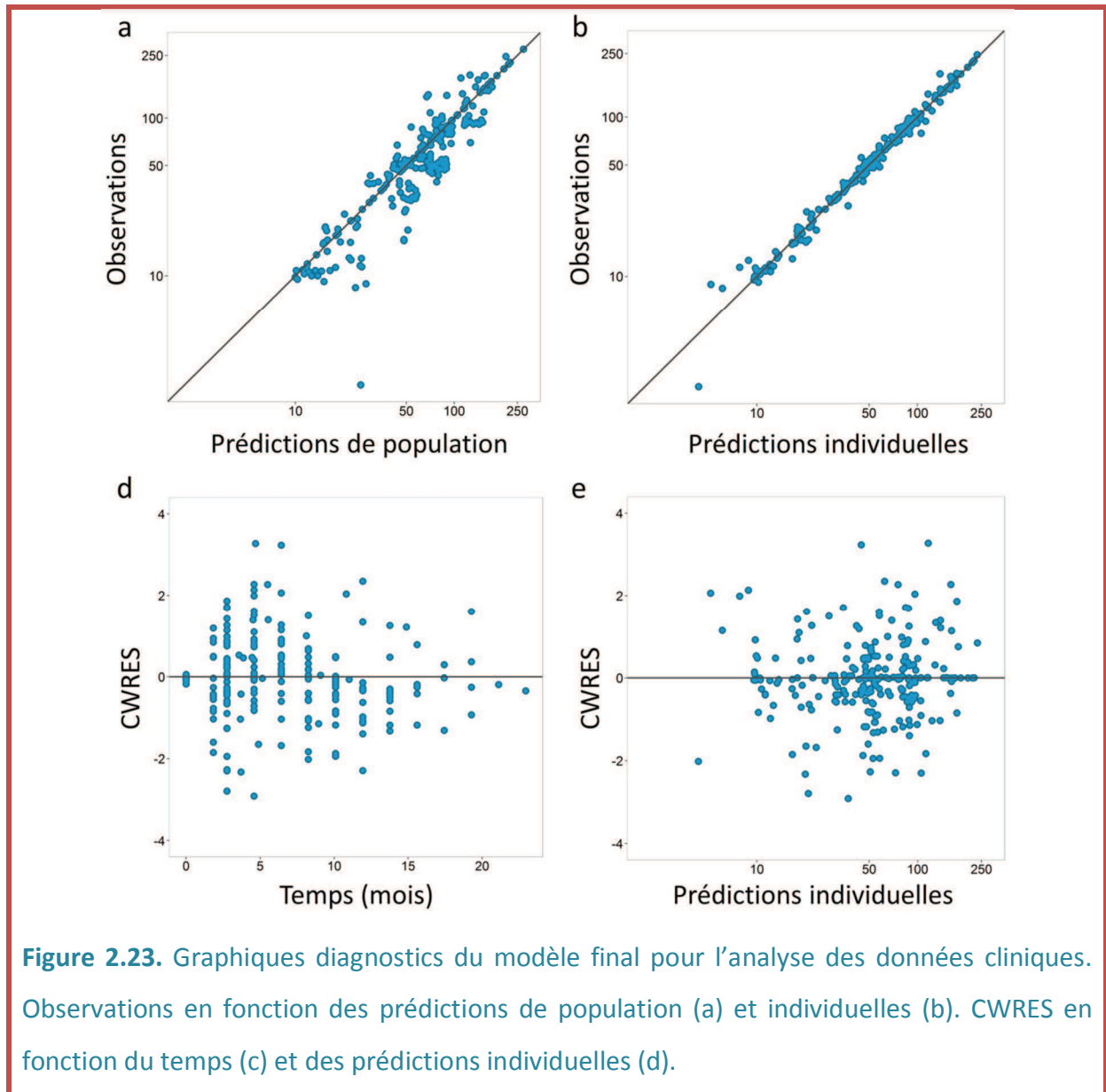


**Figure 2.22.** Ajustement entre les observations et les simulations individuelles issues de trois modèles pour un sous-groupe arbitraire de neuf patients. Les points rouges correspondent aux observations. Les lignes sont colorées en fonction du modèle ayant servi à obtenir les simulations.

Nous avons tenu à tester l'ensemble des *modèles* que nous avons utilisé lors de l'analyse des données précliniques, afin de comparer leurs capacités à reproduire les données. Le tableau 2.2 présente les valeurs de BIC pour chacun des *modèles* que nous avons utilisés pour l'analyse des données cliniques. Bien que le *modèle* final ne possède pas la valeur de BIC la plus basse, les autres critères diagnostics, dont les courbes individuelles d'ajustement (figure 2.8), les VPC (cf. publication) ou encore les graphiques diagnostics de base (figure 2.9), sont de meilleures qualités que pour les autres *modèles* dont le BIC est plus bas.

Modèle	Analyse clinique	
	BIC	$\Delta$ BIC
Claret et al. JCO 2009	1409	- 6
Modèle final	1415	-
Effet sur la taille tumorale seulement	1415	0
Wang et al. CPT 2009	1439	+24
Logistique	1442	+27
Bonate et Suttle CCP 2013	1445	+30
Gompertz	1451	+36
Stein et al BMCC 2012	1503	+88
Effet sur la capacité de charge seulement	1510	+95
Exponentiel	1559	+144
Simeoni et al. CR 2004	1583	+168

**Tableau 2.2. Résultats du critère BIC pour le screening de modèles sur les données cliniques.**  $\Delta$ BIC est la différence entre le BIC d'un modèle et celui du modèle de référence (modèle final). Les  $\Delta$ BIC sont classés par ordre croissant.



Paramètres	Unités	Résultats précliniques		Résultats cliniques		
		Estimations (RSE %)	IIV (RSE %)	Estimations (RSE %)	IIV (RSE %)	
	$\lambda$	day <sup>-1</sup>	0.166(24)	53(108)	0.0021(6)	82(35)
	$K_0$	mm <sup>3</sup>   mm	543(15)	36(77)	329(25)	Fixed to 0
<b>Paramètres du modèle</b>	$k_{ang}$	day <sup>-1</sup>	0.0183(58)	Fixed to 0	0.0392(22)	Fixed to 0
	$\gamma$	day <sup>-1</sup>	0.007(29)	19(127)	0.0023(9)	31(51)
	$\beta_\gamma$		0.332(15)		0.142(7)	
	$\alpha$	day <sup>-1</sup>	0.251(13)	24(96)	0.0032(2)	62(29)
	$\beta_\alpha$		Fixed to 0		0.125(14)	
	$\delta$	day <sup>-1</sup>	0.196(26)	42(103)	0.0153(3)	101(45)
<b>Erreur résiduelle</b>	$\varepsilon_1$ (proportionnelle)	%	14 (23)		8 (2)	
	$\varepsilon_2$ (additive)	mm <sup>3</sup>   mm	3 (17)		1 (3)	

**Tableau 2.3. Valeurs finales des paramètres estimés par approche de population.** La variabilité interindividuelle (IIV) est approximée par la racine carré de la variance estimée par NONMEM et exprimée en pourcentage tout comme les erreurs standards relatives (RSE). Pour l'analyse préclinique et clinique, le meilleur modèle d'erreur comprend une partie proportionnelle ( $\varepsilon_1$ ) et une partie additive ( $\varepsilon_2$ ). Elles sont toutes deux exprimées en écarts-types calculés à partir des variances estimées par NONMEM.  $\varepsilon_1$  est exprimé en pourcentage tandis que  $\varepsilon_2$  est de même unité que la variable observée (mm<sup>3</sup> et mm pour les tailles tumorales précliniques et cliniques respectivement).



## D. Résultats

### 1. Mise en évidence d'un double mécanisme d'action du pazopanib

Le "screening" de *modèle* que nous avons réalisé pour analyser nos données précliniques nous a permis de confirmer que le *modèle* où le pazopanib inhibe à la fois l'*angiogenèse* et la croissance tumorale est celui qui permet de décrire au mieux l'allure très particulière des dynamiques de carcinomes rénaux traités par pazopanib. Ainsi le pazopanib exercerait un premier effet sur les cellules tumorales elles-mêmes ; effet qui est rapidement contourné par la tumeur qui réussit à s'adapter pour continuer à croître. Parallèlement à cela, le pazopanib agit aussi sur la vascularisation tumorale qui se dégrade lentement et qui à son tour mène à la réduction tumorale à plus long terme. L'effet direct sur les cellules tumorales peut paraître curieux compte tenu des cibles du pazopanib qui sont majoritairement pro-angiogéniques. Néanmoins, des études ont montré que l'activation des récepteurs du VEGF au niveau des cellules tumorales joue un rôle important dans leur prolifération, leur migration et leur résistance à l'apoptose [3, 4]. Nous savons que les carcinomes à cellules rénales sur-expriment ces récepteurs et leurs ligands à cause de la mutation du gène VHL. Bien sûr, ces explications restent hypothétiques et nécessitent d'être étudiées pour être confirmées.

Le second résultat majeur, c'est que ce double mécanisme d'action mis en évidence chez la souris, pourrait aussi avoir lieu chez l'homme puisqu'il est indispensable pour décrire précisément la dynamique tumorale chez les patients. Cela sous-entend que le pazopanib exercerait aussi une action cytotoxique brève et une action anti-angiogénique continue chez l'homme.

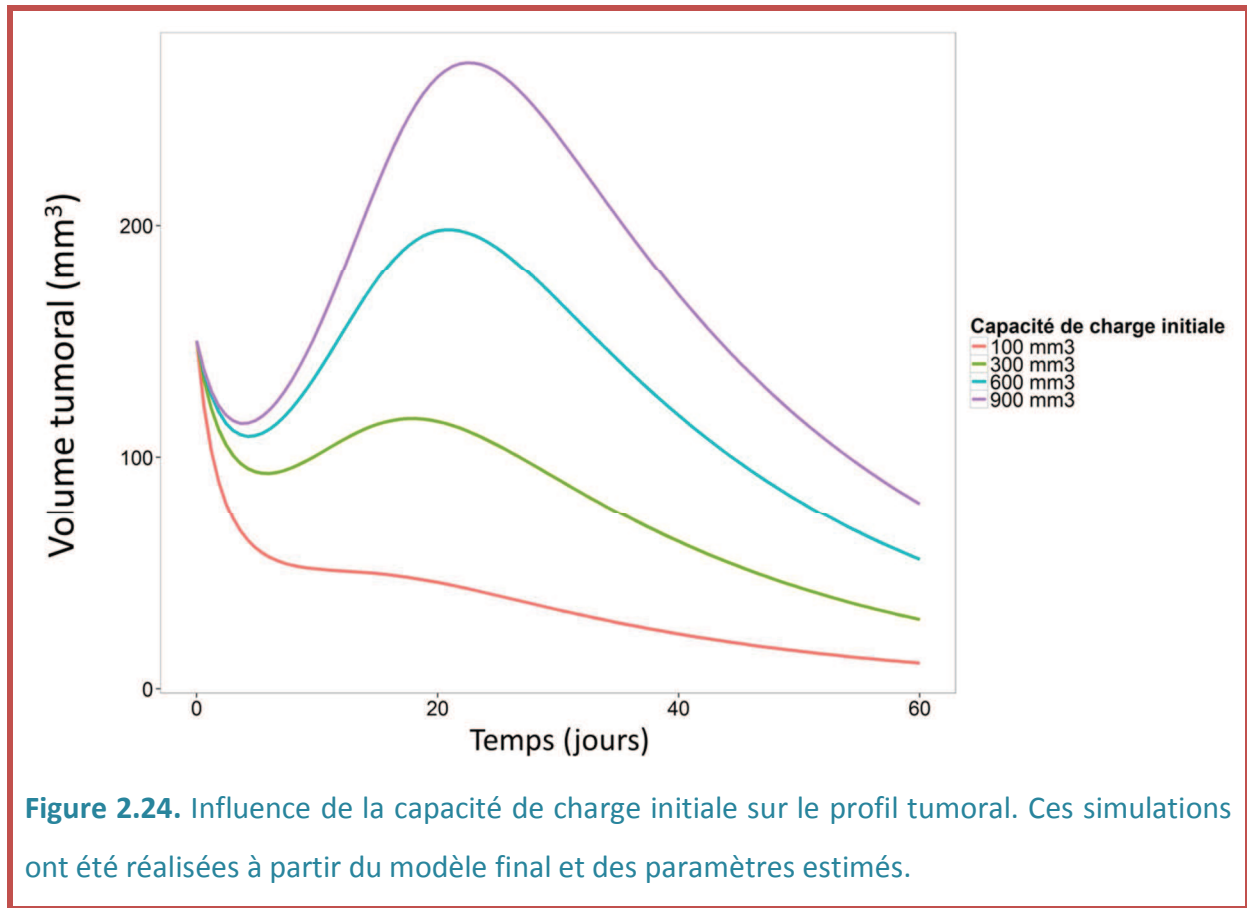
## 2. Le rôle des données précliniques pour l'analyse clinique de la dynamique tumorale

De prime abord, lorsque l'on regarde les données cliniques, il est difficile de penser d'emblée à un modèle avec un double effet car les dynamiques tumorales ne sont pas complètes chez l'homme, puisque les processus sont bien plus longs et plus difficiles à suivre au long cours. C'est en cela que l'utilisation des données précliniques est une approche intéressante. Il est plus facile d'avoir à disposition des dynamiques complètes chez la souris et ce très rapidement étant donné la vitesse des croissances tumorales chez cette espèce. De plus, le suivi des tailles tumorales est facilement réalisable, ce qui permet d'avoir un nombre conséquent d'observations par souris.

Ainsi, nous avons pu montrer l'utilité de l'analyse préclinique pour la description clinique des dynamiques tumorales. Les démarches que nous avons suivies, ainsi que les hypothèses que nous avons tirées de l'analyse des données précliniques riches, nous ont permis de mieux comprendre comment le pazopanib agit sur les carcinomes rénaux humains, et ce malgré le petit nombre de données cliniques dont nous disposions.

## E. Discussion et impact sur le développement clinique du pazopanib

La force de ce modèle réside dans le fait qu'il permet de décrire de façon adéquate les différents profils tumoraux que l'on observe chez les patients. Cela dépend de la capacité de charge initiale, c'est-à-dire la taille maximale que la tumeur peut atteindre étant donné son état vasculaire lors de la première administration de pazopanib. La figure 2.10 illustre les effets de la capacité de charge initiale sur la dynamique tumorale.



Plus la capacité initiale est élevée par rapport à la taille tumorale initiale et plus la croissance sera importante. Cela signifie que la tumeur est très vascularisée et que par conséquent, la dégradation du réseau vasculaire met beaucoup de temps avant de réduire le volume tumoral. Ainsi, ce modèle possède une très grande flexibilité quant aux profils tumoraux qu'il peut décrire. Qu'il y ait une croissance ou non, notre modèle semi-mécanistique est parfaitement capable de s'adapter et de décrire l'évolution du carcinome rénal.

Enfin, ce travail soulève la rationalité des critères RECIST comme facteur d'évaluation de l'évolution de la maladie et par conséquent comme facteur influençant l'arrêt ou non du traitement pour un patient. En effet, notre modèle prédit, pour certains individus, une croissance qui précède une réduction tumorale d'apparition tardive liée à l'effet anti-

angiogénique du pazopanib. Il est très probable que cette recroissance puisse excéder les 20% (par rapport à la plus petite SLD) et que par la suite, un patient soit classé à tort comme progressant alors qu'il ne l'est pas. Si on regarde la figure 2.3, on peut légitimement imaginer que les patients du groupe C aient arrêté prématurément le pazopanib alors qu'une décroissance tardive était à prévoir, comme c'est le cas pour les patients du groupe B. La conclusion de ce constat est que les effets du pazopanib pourraient être sous-estimés chez l'homme. Dans ce cas particulier où une décroissance à long-terme est à prévoir, il serait plus judicieux d'évaluer différemment l'efficacité du pazopanib que par les critères RECIST. Par exemple, en fixant une durée d'étude minimale pour s'assurer que la tumeur va effectivement décroître comme chez les souris ; ou bien en augmentant le seuil pour lequel la maladie est considérée comme progressive.

## F. Limites du modèle

La limite principale du modèle réside dans sa complexité. Il est naturel qu'un modèle comportant un plus grand nombre de paramètres décrive mieux les données qu'un modèle moins paramétré. Cependant nous avons vu dans les tableaux 2.1 (analyse préclinique) et 2.2 (analyse clinique), qui comparent le critère BIC pour différents modèles, que le modèle final possède le BIC le plus bas lors de l'analyse préclinique et le deuxième plus petit BIC en ce qui concerne l'analyse des données cliniques. Ces résultats sont encourageants pour conclure que le modèle final est adéquat pour décrire les données à disposition et n'est pas sur-paramétré. Pour ce qui est de l'analyse des données cliniques, nous pouvons remarquer que la valeur du critère BIC du modèle développé par Claret et collègues [9], ainsi que celui du modèle comportant seulement un effet sur la taille tumorale, est respectivement

inférieure et équivalente à celle de notre modèle final. Cela est certainement dû au fait que les données cliniques ne permettent pas de rendre significatif un effet anti-angiogénique du pazopanib puisque la décroissance tardive liée à cet effet n'est pas observée chez tous les patients comme le montre la figure 2.3 où les groupes A et C regroupent la majorité des patients. Une analyse de type "mixture modeling" pourrait montrer que pour les patients des groupes A et C, le modèle développé par Claret et collègues, ou celui avec un unique effet du pazopanib sur les cellules tumorales, serait plus approprié pour décrire les dynamiques tumorales ; tandis que pour les patients du groupe B, le modèle final serait plus adéquat. Néanmoins, notre objectif principal est d'émettre des hypothèses quant au(x) potentiel(s) mécanisme(s) d'action du pazopanib chez l'homme grâce à une analyse préclinique préalable ; ce que nous avons pu réaliser grâce à notre modèle final. Nous pouvons légitimement penser que si les patients du groupe C, qui ont été retirés de l'étude suite à une progression de la tumeur sous traitement, avaient continué l'essai, une décroissance tardive aurait pu être observée et par conséquent, l'effet anti-angiogénique du pazopanib aurait pu être mis en évidence de façon significative. Pour confirmer ce constat, il faudrait réaliser une nouvelle étude sur une durée fixe pour tous les patients, sans prendre en compte la progression de la maladie comme critère d'exclusion de l'essai clinique sous réserve que la qualité de vie du patient n'en soit pas dégradée.

De plus, la précision sur certains paramètres précliniques et sur leur variabilité interindividuelle est assez mauvaise comme en témoignent les pourcentages des "residual standard error" (RSE%) qui sont assez élevés (tableau 1 de la publication ci-dessus). Cela peut d'une part s'expliquer par l'hétérogénéité des profils tumoraux entre les souris, couplée à un faible nombre de souris par groupe. D'autre part, le modèle estime des

paramètres virtuels, comme la capacité de charge initiale  $K_0$  ou  $k_{ang}$ , pour lesquels très peu, voire aucune information provenant de la dynamique tumorale n'est disponible pour pouvoir précisément les estimer. Néanmoins, nous pensons que ces paramètres restent nécessaires pour pouvoir prendre en compte le processus d'angiogenèse et ainsi modéliser un effet anti-angiogénique du traitement. Sans doute qu'une étude sur un plus grand nombre de souris permettrait d'améliorer la précision sur les paramètres sous réserve que les profils tumoraux sous pazopanib restent similaires.

## G. Références

1. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al. (2011) The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 60:615–21. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.049
2. Finley DS, Pantuck AJ, Beldegrun AS (2011) Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. *Oncologist* 16 Suppl 2:4–13. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S2-04
3. Epstein RJ (2007) VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic. *Cancer Metastasis Rev* 26:443–52. doi: 10.1007/s10555-007-9071-1
4. Masood R (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98:1904–1913. doi: 10.1182/blood.V98.6.1904
5. Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, et al. (2007) Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis

- inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* 6:2012–21. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0193
6. Hutson TE, Davis ID, Machiels J-PH, et al. (2010) Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 28:475–80. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6994
  7. Eisenhauer E a, Therasse P, Bogaerts J, et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45:228–47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026
  8. Bonate PL, Suttle a B (2013) Modeling tumor growth kinetics after treatment with pazopanib or placebo in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 72:231–40. doi: 10.1007/s00280-013-2191-0
  9. Claret L, Bruno R (2014) Assessment of tumor growth inhibition metrics to predict overall survival. *Clin Pharmacol Ther* 96:135–7.

## **CHAPITRE 3**

---

**MODELISATION SEMI-MECANISTIQUE DES  
EFFETS CLINIQUES DU BEVACIZUMAB ET DE  
L'EVEROLIMUS SUR LES SCHWANNOMES  
VESTIBULAIRES DE PATIENTS ATTEINTS DE  
NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 2**

---



## I- PUBLICATION

### **Mechanism-Based Modeling of the Clinical Effects of Bevacizumab and Everolimus on Vestibular Schwannomas of Patients with Neurofibromatosis Type 2**

Aziz Ouerdani<sup>1</sup>, Stéphane Goutagny<sup>2</sup>, Michel Kalamarides<sup>3, a</sup>, Iñaki F. Troconiz<sup>4</sup>, Benjamin Ribba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inria, project team NuMed, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.

<sup>2</sup> Neurosurgery, Beaujon Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Clichy, France.

<sup>3</sup> Neurosurgery, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 75013-Paris, France.

<sup>a</sup> Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06-France

<sup>4</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy; University of Navarra, Pamplona, Spain

**Running title:** Modeling of bevacizumab and everolimus effects on vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2

## **Abstract**

Purpose: To describe the natural growth of vestibular schwannoma in patients with neurofibromatosis type 2 and to predict tumor volume evolution in patients treated with bevacizumab and everolimus.

Methods: Clinical data, including longitudinal tumor volumes in patients treated by bevacizumab (n=13), everolimus (n=7) or both (n=2), were analyzed by means of mathematical modeling techniques. Together with clinical data, data from the literature were also integrated to account for drugs mechanisms of action.

Results: We developed a model of vestibular schwannoma growth that takes into account the effect of vascular endothelial growth factors and mammalian target of rapamycin complex 1 on tumor growth. Behaviors such as tumor growth rebound following everolimus treatment stops, was correctly described with the model. Preliminary results indicate that the model can be used to predict, based on early tumor volume dynamic, tumor response to variation of treatment dose and regimen.

Conclusion: The developed model successfully describes tumor volume growth before and during bevacizumab and/or everolimus treatment. It might constitute a rational tool to predict patients' response to these drugs thus potentially improving management of this disease.

**Keywords:** Oncology, Disease progression model, Population pharmacokinetics-pharmacodynamics, Mixed-effect models, Mechanism-informed models, NF2, Vestibular schwannoma

## Introduction

Neurofibromatosis type 2 (NF2) is an autosomal dominant disease characterized by the development of multiple benign tumors in the central and peripheral nervous system[1]. Bilateral vestibular schwannoma (VS) is the principal manifestation of the NF2 and the one that provokes the most serious morbidities, such as definitive hearing loss, facial function disorders and rarely death[2]. Although total tumor removal is the best option to stop tumor growth, it is likely to sacrifice auditory nerve and may sacrifice facial nerve leading to disastrous consequences for the patient. The chances to save nerves decrease with larger tumor size. Standard drug treatment does not exist for such disease and need to be developed. However bevacizumab, a monoclonal antibody that targets the vascular endothelial growth factor (VEGF), and everolimus – an inhibitor of the mammalian target or rapamycin complex 1 (mTORC1)[3, 4] involved in cell proliferation, survival, and angiogenesis[5] – have been the subject of multiple studies in NF2 patients[6–11]. As the main goal of NF2 medical care is to preserve the patients' quality of life and to protect as much as possible the nerves functions, predicting VS growth and response to treatments would be crucial to better personalize treatments[2, 12, 13]. Recently, model-based individual prediction of tumor size response to treatment has been shown to be a relevant approach for rationalizing treatment decision in oncology[14, 15].

Herein, we present an analysis of clinical tumor volume longitudinal data to characterize and predict the growth of VS in NF2 patients prior and during therapy with bevacizumab and/or everolimus.

## Materials and methods

### *Patients and treatments*

We analyzed tumor volume data from 7 patients included in a clinical trial evaluating everolimus[10], as well as 13 patients treated by bevacizumab and 2 patients treated with both everolimus and bevacizumab in our tertiary reference center on a compassionate basis. The local institutional review board approved this retrospective chart review. All patients provided written informed consent. Table 1 summarizes the patients' data. Tumor volume of target VS were assessed with 3D volumetric sequences by MRI[10]. Tumor volume data were available in patients before, during and after treatment period. Bevacizumab was given intravenously (iv) at a dose of 5 mg/kg every 2 weeks. Everolimus was given orally at a dose of 10 mg once daily.

### *Data modeling*

Nonlinear mixed-effect modeling (NLME)[16] techniques were used to analyze the tumor size clinical data. The developed model contains two elements: a structural model and a statistical part[17]. The structural model describes the typical time course of the variable of interest (in our case the target VS volume) of the population. It can be represented by analytic functions or systems of ordinary differential equations (ODEs)[18]. The statistical model attempts to describe observed variability due to the differences among individuals (inter-individual variability or IIV) or due to unexplained sources, e.g. errors associated with tumor size assessments (residual error).

The time course of VS volumes obtained from the 22 patients were simultaneously analyzed. VS sizes were logarithmically transformed and IIV parameters was modeled with an exponential model. Parameters estimation was performed by the stochastic approximation of expectation minimization (SAEM) algorithm implemented in NONMEM 7.2[19]. Model selection was driven by the value of the Bayesian information criterion (BIC), the relative standard error (RSE) of estimates and goodness of fit plots.

Evaluation of the final model was performed using the parameters precision assessed by the RSE% of the parameter estimates. 95% confidence interval of the parameter estimates was also calculated from 500 studies simulated by a bootstrap analysis to strengthen the evaluation of the parameter precision. Model evaluation was also based on the quality of the visual predictive check (VPC) that were performed by simulating 500 studies from where the 95% confidence intervals of the 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles of the tumor dynamics were calculated. VPCs were stratified by compound received by the patients. The two patients that received both compounds were added in both bevacizumab and everolimus VPC.

We assessed the validity of the model to predict tumor size dynamic by sampling individual parameter posterior distribution with Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in NONMEM 7.2[19]. One thousand samples, obtained in the stationary phase of the MCMC algorithm were used to characterize the posterior distribution.

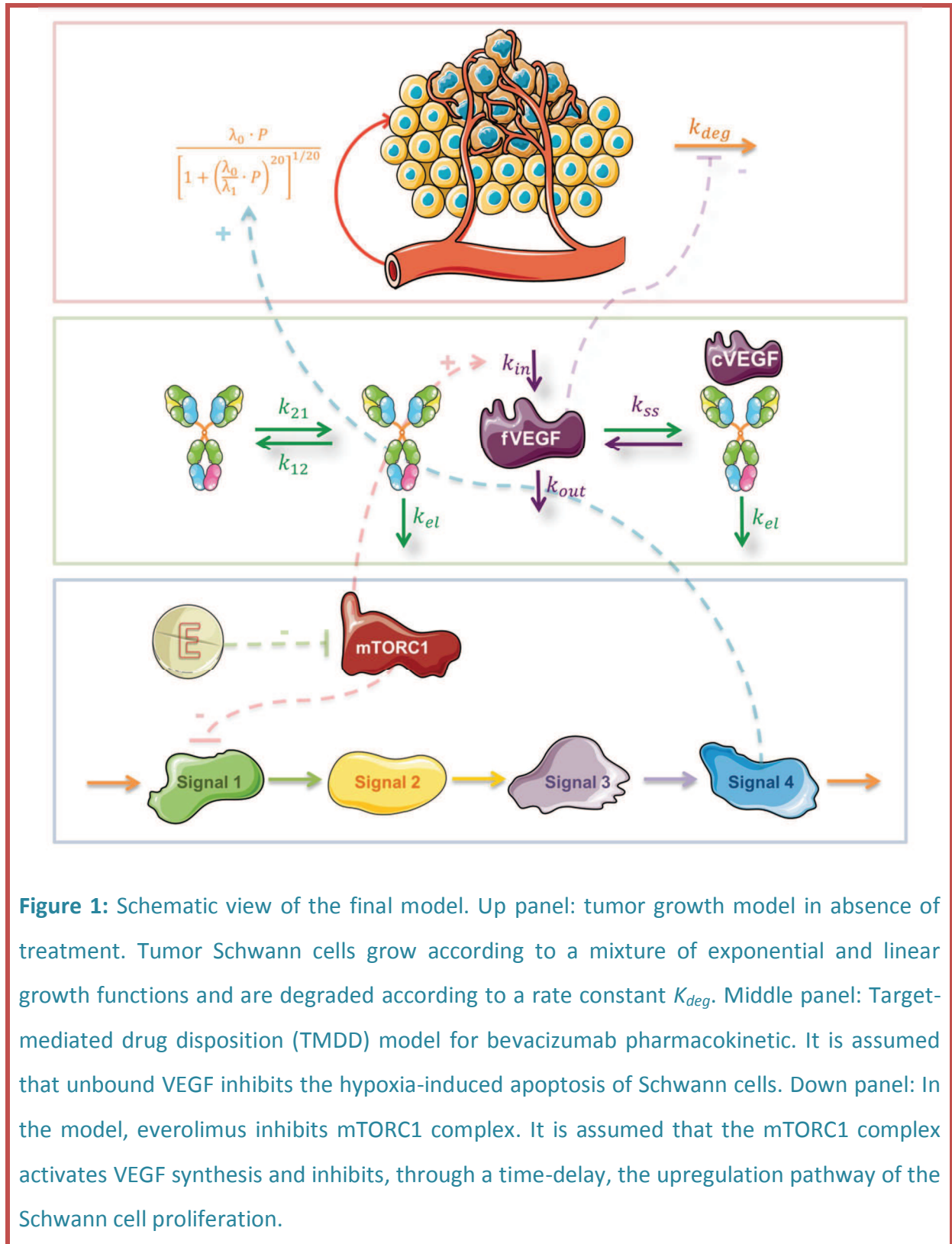
Demographic		
<b>Gender</b>	Male	N = 5
	Female	N = 17
<b>Age (years)</b>	At 1 <sup>st</sup> symptoms	19 (2 – 41) [median (min – max)]
	At treatment onset	26.4 (16.7 – 51.5) [median (min – max)]
Tumor size evaluation		
<b>Number of tumor size assessments prior to treatment starts</b>		5 (0 – 10) [median (min – max)]
<b>Total number of tumor size assessments per patients</b>		10.5 (2 – 17) [median (min – max)]
<b>Baseline tumor size (cm<sup>3</sup>)</b>		1.5 (0.03 – 14) [median (min – max)]
<b>Site of target tumor</b>	Right	N = 8
	Left	N = 14
<b>Other tumors</b>	Meningiomas	N = 16
	Others	N = 17
Treatment		
<b>Compounds</b>	Bevacizumab	N = 13
	Everolimus	N = 7
	Both	N = 2
<b>Treatment</b>	Duration (months)	12 (4 – 34) [median (min – max)]
	Temporary interruption	N = 8
	Ongoing	N = 15
<b>Time before beginning of treatment (years)</b>		4.6 (0 – 8.3) [median (min – max)]
<b>Table 1: Summary of the demographic, tumor and treatment data.</b>		

### **Model development**

The proposed mathematical model is composed of two modules: a model for tumor size growth in absence of any therapeutic intervention; and a model for treatments effect on biological target (VEGF). The proposed model is represented schematically in Fig. 1 and mathematically in equations 1-14.

### **Tumor dynamics**

Tumor dynamics is represented by equation 1, and is governed by a proliferation and an apoptotic term. The former is described through two phases as was first proposed by Simeoni et al., 2004[20]: an initial exponential growth followed by a linear one, rolled by the parameters  $\lambda_0$  and  $\lambda_1$ , respectively; and the latter by the first order process governed by the  $K_{deg}$  parameter. Apoptosis is modulated by the biomarker VEGF as described in equation 1. There is literature data supporting the fact that increased levels of VEGF provides direct protection of the Schwann cells against apoptosis induced by hypoxia[21–24]. Studies showed that the VEGF inhibition lead to a significant reduction of the Schwann cells survival due to increased hypoxia-induced apoptosis[21, 22, 25]. In the current model and in absence of treatment  $VEGF_u$ , unbound (free) VEGF concentrations equals  $VEGF_{u,0}$ , free VEGF concentrations at the time of the start of the study. Therefore in equation 1  $(1 - (VEGF_u/VEGF_{u,0})) = 0$ , leaving proliferation as a function of the parameters  $\lambda_0$  and  $\lambda_1$ , and blocking apoptosis, respectively.



**Figure 1:** Schematic view of the final model. Up panel: tumor growth model in absence of treatment. Tumor Schwann cells grow according to a mixture of exponential and linear growth functions and are degraded according to a rate constant  $K_{deg}$ . Middle panel: Target-mediated drug disposition (TMDD) model for bevacizumab pharmacokinetic. It is assumed that unbound VEGF inhibits the hypoxia-induced apoptosis of Schwann cells. Down panel: In the model, everolimus inhibits mTORC1 complex. It is assumed that the mTORC1 complex activates VEGF synthesis and inhibits, through a time-delay, the upregulation pathway of the Schwann cell proliferation.



$$\frac{dT_S}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot T_S}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot T_S\right)^{20}\right]^{1/20}} - K_{deg} \cdot \left(1 - \left(\frac{VEGF_u}{VEGF_{u,0}}\right)\right) \cdot T_S \quad (1)$$

$$T_S(t = 0) = T_{S_0}.$$

$T_S$ , and  $T_{S_0}$  represent tumor size at any time of the study and at the start of patient monitoring ( $t=0$ ), respectively. Therefore  $T_{S_0}$  corresponds to the initial condition and it is a parameter to be estimated in the model.

The units for the parameters  $\lambda_0$  and  $K_{deg}$  are  $\text{month}^{-1}$ ;  $\lambda_1$  is in  $\text{cm}^3/\text{month}$ . Tumor size is described in  $\text{cm}^3$ , and  $VEGF_u$  is given in nM. The model assumes that independent from tumor size and in absence of treatment with anti-angiogenic effects, levels of  $VEGF_u$  remain constant through the whole period of study and equal to  $VEGF_{u,0}$ . Then changes in  $VEGF_u$  as a result of the treatment have immediate effects on tumor dynamics.

### Drug effects on VEGF

#### *Bevacizumab effects*

In the current study neither pharmacokinetic data of bevacizumab nor levels of VEGF were available. Drug exposure profiles were generated using the model, and its corresponding typical population parameters, obtained in a population pharmacokinetic analysis performed with data from a phase III clinical trial[26] on patient with various types of solid tumors. With respect to the VEGF profiles in presence of bevacizumab treatment, the same strategy was followed. The target mediated model under the quasi-steady-stated conditions published recently was used[27]. Equations 2-7 represent the model used to account for the bevacizumab effects on  $VEGF_u$ .

$$Bev_u = \frac{1}{2} \left[ (Bev_T - VEGF_T - k_{ss}) + \sqrt{(Bev_T - VEGF_T - k_{ss})^2 + 4 \cdot k_{ss} \cdot Bev_T} \right] \quad (2)$$

$$\frac{dBev_T}{dt} = \frac{Q}{V_2} Bev_p - \left( \frac{CL}{V_1} + \frac{Q}{V_1} \right) \cdot Bev_u - \frac{VEGF_T \cdot \frac{CL_{RC}}{V_1} \cdot Bev_u}{k_{ss} + Bev_u} \quad (3)$$

$$\frac{dBev_p}{dt} = \left( \frac{Q}{V_1} \right) \cdot Bev_u - \frac{Q}{V_2} Bev_p \quad (4)$$

$$\frac{dVEGF_T}{dt} = k_{in} - k_{out} \cdot VEGF_T - \left( \frac{CL_{CR}}{V_1} - k_{out} \right) \cdot \frac{VEGF_T \cdot Bev_u}{k_{ss} + Bev_u} \quad (5)$$

$$Complex = \frac{VEGF_T \cdot Bev_u}{k_{ss} + Bev_u} \quad (6)$$

$$VEGF_u = VEGF_T - Complex \quad (7)$$

$Bev_u$  is the free bevacizumab concentration in nM that binds to the  $VEGF_u$  to form a *Complex* according to a one-to-one binding process.  $Bev_T$  and  $Bev_p$  are the total and peripheral bevacizumab concentrations in nM respectively;  $k_{ss}$  is the steady-state constant defining the equilibrium between  $Bev_u$ ,  $VEGF_u$ , and the *Complex*.  $V_1$  and  $V_2$  are respectively the central and peripheral volumes of distribution of the bevacizumab, and  $Q$  represents its inter-compartmental clearance.  $k_{in}$  and  $k_{out}$  are the zero-order synthesis and first-order elimination constants of the  $VEGF_u$ .  $CL$  is the elimination clearance of the  $Bev_u$ . It is supposed that the *Complex* is eliminated according to an elimination clearance  $CL_{RC}$  that is equal to  $CL$ . The initial conditions of the system are  $Bev_{T,0} = Dose/V_1$ ,  $VEGF_{T,0} = VEGF_{u,0}$ , and  $Bev_{p,0} = 0$ . To convert the dose from mg/kg to mg, we used a standard weight of 70 kg instead of the observed weight (mean weight = 65 kg, standard-deviation = 8kg). We assume that the

resulting bevacizumab concentration profiles are expected to be similar among patients as the variability on the weight is small. The dose was then converted in nM by using the molecular weight of the bevacizumab (149  $\mu\text{g}/\text{mol}$  [28]). The parameter values used in this analysis are provided in the Supplemental Table 1.

#### *Everolimus effects*

There is evidence that everolimus blocks the mTORC1 complex[10, 11, 29]. In the current model such mechanism of action was described with an inhibitory  $I_{\text{MAX}}$  model as represented in equation 8. In absence of drug mTORC1 equals to 1. The dose in mg was converted in nM using the molecular weight of the everolimus (958  $\text{g}/\text{mol}$  [30]).

$$mTORC1 = \frac{IC_{50}}{IC_{50} + C_{Eve}} \quad (8)$$

Where  $IC_{50}$  is the everolimus concentration ( $C_{Eve}$ ) in nM that reduces the mTORC1 level by 50%. mTORC1 value at the start of the study ( $mTORC1_{,0}$ ) was set to 1. Everolimus concentration was simulated from an oral two compartment model with first-order linear absorption and elimination[30] developed from various phase I studies on patients with renal cell carcinoma. To reduce significantly the run times  $C_{Eve}$  was finally equal to the trough concentration at steady-state.

The effect of everolimus on VEGF is through an mTORC1 related upregulation of the zero-order production of the VEGF[31]. Equation 5 now becomes equation 9 as follows:

$$\frac{dVEGF_T}{dt} = k_{in} \cdot mTORC1 - k_{out} \cdot VEGF_T - \left( \frac{CL_{CR}}{V_1} - k_{out} \right) \cdot \frac{VEGF_T \cdot Bev_u}{k_{SS} + Bev_u} \quad (9)$$

As can be seen in the supplementary Fig. S1, patients treated with everolimus experienced, once the treatment was stopped, a temporary faster increase in tumor size compared to the pre-treatment period. It has been reported that continuous inhibition of the mTORC1 pathway triggers the upregulation of proliferation signal pathways promoting tumor development[3, 4]. Equations 10-13 describe the profiles of the above discussed signals. A chain of transit compartments has been included to delay the effect of the inhibition of mTORC1 that lead to the activation of the tumor proliferation.

$$\frac{dSignal_1}{dt} = \frac{mTORC1_0}{mTORC1} - Signal_1 \quad (10)$$

$$\frac{dSignal_2}{dt} = Signal_1 - Signal_2 \quad (11)$$

$$\frac{dSignal_3}{dt} = Signal_2 - Signal_3 \quad (12)$$

$$\frac{dSignal_4}{dt} = Signal_3 - Signal_4 \quad (13)$$

At the start of the study the levels of *Signal* in each of the transit compartments were set to 1. *Signal1* to *Signal4* represent the different proteins involved in the upregulation of tumor proliferation.

Equation 14 replaces equation 1 including the VEGF effects (modulated by bevacizumab and everolimus) together with the delayed upregulation triggered by the everolimus-induced inhibition of the mTORC1 pathway, on tumor dynamics.

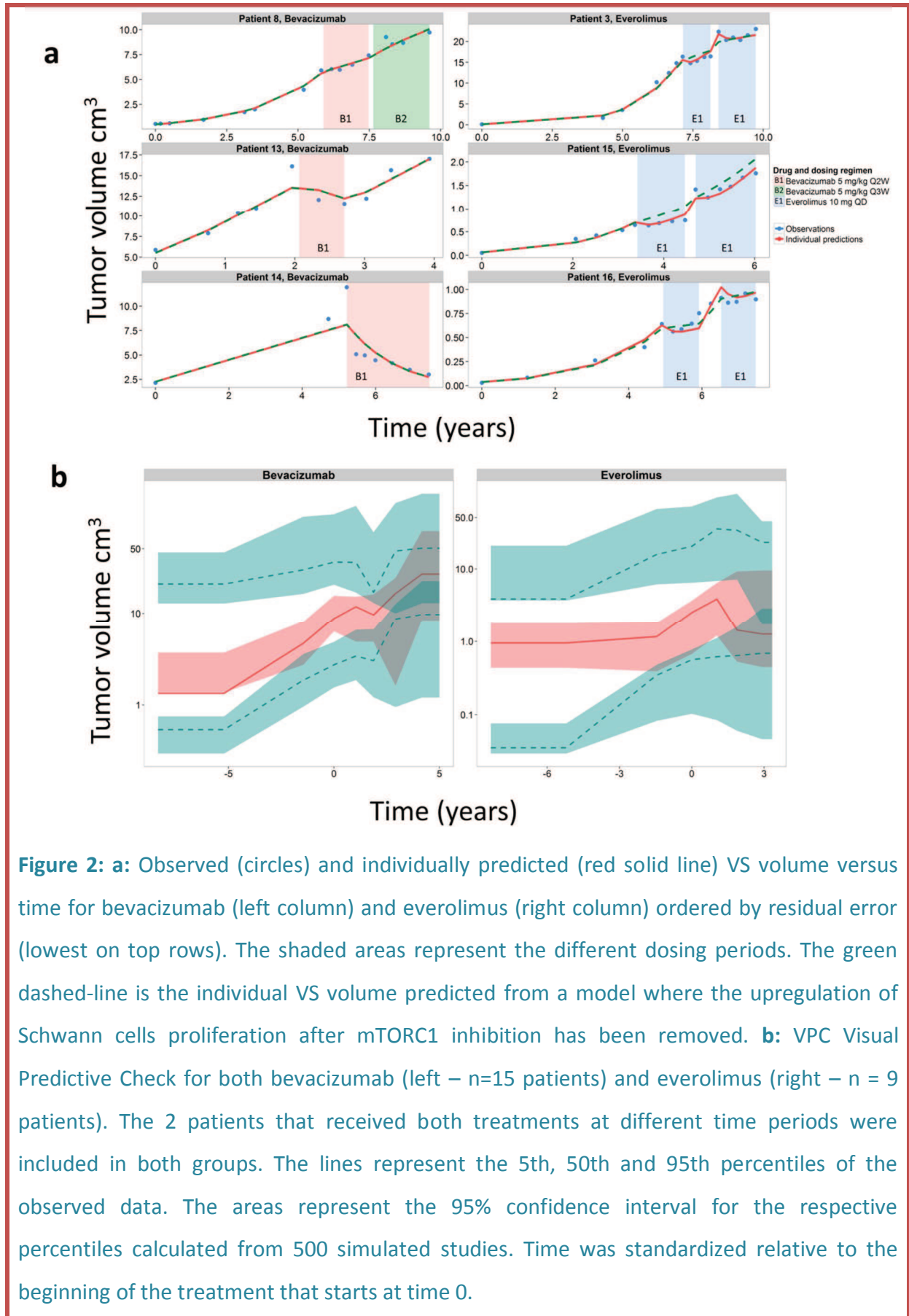
$$\frac{dTS}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot TS}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot TS\right)^{20}\right]^{1/20}} \cdot Signal_4 - K_{deg} \cdot \left(1 - \left(\frac{VEGFu}{VEGFu_0}\right)\right) \cdot TS \quad (14)$$

Parameters  $\lambda_0$ ,  $\lambda_1$ ,  $TS_0$ ,  $K_{deg}$  and  $IC_{50}$  are the five parameters to be estimated. All other parameters were fixed to literature values.

## Results

The natural growth of the VS is adequately described by the final model (Fig. 1, Eq. 14) as testified by the good quality of the individual predictions (Fig. 2a), the VPCs (Fig. 2b) and the precision of the parameter estimates (Table 2). Data provide enough information to estimate the IIV of parameters  $\lambda_0$ ,  $\lambda_1$  and  $TS_0$ ; but not enough for parameter  $IC_{50}$  whose IIV was fixed to a small value (15%). Regarding  $K_{deg}$  we compelled its IIV to a higher value (40%) to allow the model to adequately describe the patients dynamics, assist the SAEM algorithm to compute, and increase significantly the quality of the VPCs. The small condition number (23) testifies that the model is not over-parametrized. We tested simpler functions to describe the VS growth (e.g., linear, exponential, logistic, Gompertz and generalized logistic function with a carrying capacity as described in Ouerdani et al 2015[32]) on the non-treated part of the tumor dynamic initially and on the bevacizumab and everolimus group separately. None of these functions could improve the goodness of fit plots or the BIC value compared to the Simeoni function.

Note that direct effect of the drug concentrations reducing the Simeoni growth was tested on bevacizumab and everolimus treated patients separately.



Parameter (units)	Estimate (rse%)	95% CI	IIV % (rse%)	95% CI	Shrinkage %
$\lambda_0$ (month <sup>-1</sup> )	0.046 (3)	0.042 – 0.05	28 (26)	19 – 36	22
$\lambda_1$ (cm <sup>3</sup> /month)	0.31 (36)	0.22 – 0.43	100 (29)	60 – 135	29
Stage 1 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	0.053 (6)	0.038 – 0.079			
Stage 2 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	0.54 (23)	0.45 – 0.67			
Stage 3 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	3.49 (11)	2.78 – 4.53	36 (16)	26 - 39	3
Stage 4 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	11.36 (8)	10.01 – 13.17			
K <sub>deg</sub> (month <sup>-1</sup> )	0.099 (7)	0.081 – 0.12	40 Fixed	40 Fixed	
IC <sub>50</sub> (nM)	12.43 (27)	10.4 – 26.78	15 Fixed	15 Fixed	
$\epsilon$	35 (6)	32 – 37			2

**Table 2:** Model parameter estimates of the simultaneous analysis of bevacizumab and everolimus treated patients. Inter-individual variability (IIV) is approximated by the square root of the variance (omega) estimated by NONMEM and expressed as a percentage together with standard errors of estimates (RSE).  $\epsilon$  is the additional residual error in the logarithmic scale. As for IIVs,  $\epsilon$  is expressed as a standard-deviation in percent.

In both groups BIC values were similar compared to the selected model but individual fits and goodness of fit plots was worsened in the everolimus group. As one of the main objectives is to describe the rebound of the VS growth after the everolimus interruption, we decided to keep the mechanism-based model described in Fig. 1. This model provides more relevant information in this purpose and allows the use of a unique model that presents the particularity of having two different sites of action.

### ***Natural history of the VS growth***

The threshold tumor size  $TS_{th}$  ( $TS_{th} = \frac{\lambda_1}{\lambda_0}$ ) corresponds to the threshold from which the rate of tumor growth switches from exponential to linear. Tumor smaller than around  $7 \text{ cm}^3$  (VS stage 1 to 3) grow exponentially with a doubling time of around 15 months. After  $7 \text{ cm}^3$  (VS stage 4) VS grow linearly at a rate of  $0.3 \text{ cm}^3$  per month.

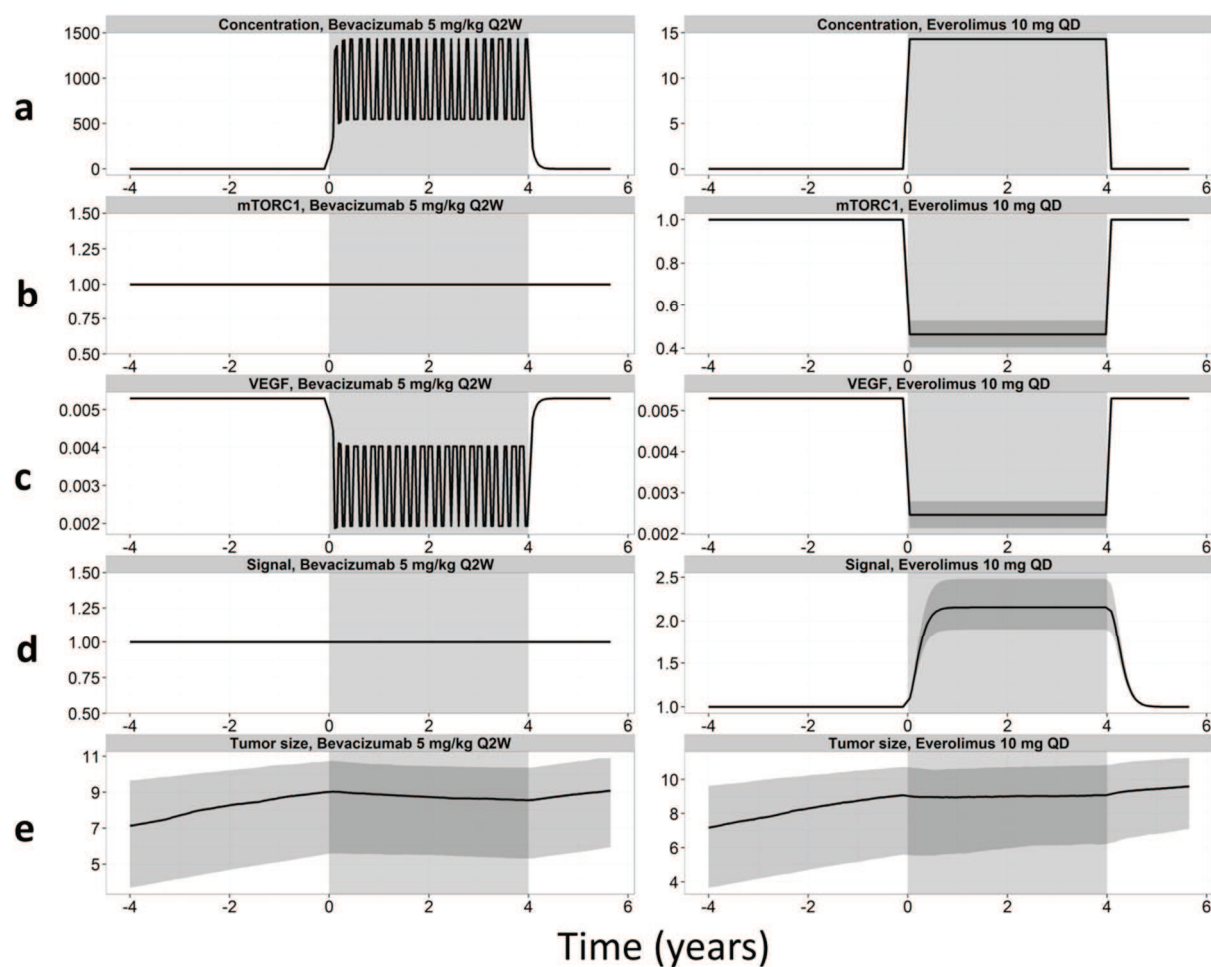
### ***Comparison of bevacizumab and everolimus effects***

Fig. 3 displays the time course of the bevacizumab and everolimus concentrations and their effects on the mTORC1 and  $VEGF_u$  levels, on the final signal of the upregulation pathway (*Signal4* in equation 14) and finally on the VS dynamics. After bevacizumab administration,  $VEGF_u$  concentration is decreased and leads to tumor shrinkage whereas mTORC1 and *Signal* levels remain unchanged. This is in agreement with literature findings[7–9].

In our model, when everolimus is given,  $VEGF_u$  concentration is reduced thanks to mTORC1 inhibition. Tumor size starts to decrease but because of the delayed activation of the last signal of the upregulation pathway, the proliferation rate is doubled and tumor regrows. The rebound after the everolimus stop is caused by the return to the basal level of the  $VEGF_u$  concentration added to the still elevated signal that over-activates the proliferation of the VS.

Everolimus reduces the mTORC1 level by almost 60% and so acts efficiently on the  $VEGF_u$  concentration (Fig. 3).





**Figure 3:** Median of the individual profiles of the different elements of the model simulated from 1000 individuals for the bevacizumab (left column) and 1000 individuals for everolimus (right column). Treatment is given during 4 years (grey rectangle) after a non-treated period of 4 years. The areas display the 95% confidence interval of the median of the individual predictions (lines). A: Concentration of the drug in nM simulated from the TMDD model for bevacizumab and a two-compartment model with first-order absorption and elimination for everolimus. The concentration of the everolimus simulated by NONMEM is the trough concentration at steady-state. B: mTORC1 level. The area around the line shows the plausible range of values of  $IC_{50}$  allowed by the 15% IIV of the parameter. C: VEGF concentration in nM. The area of possible VEGF concentrations is the consequence of the variability on mTORC1 level. D: Intensity level of signal 4 (see Figure 1) in the pathway driving Schwann cells proliferation. E: Tumor size dynamic.

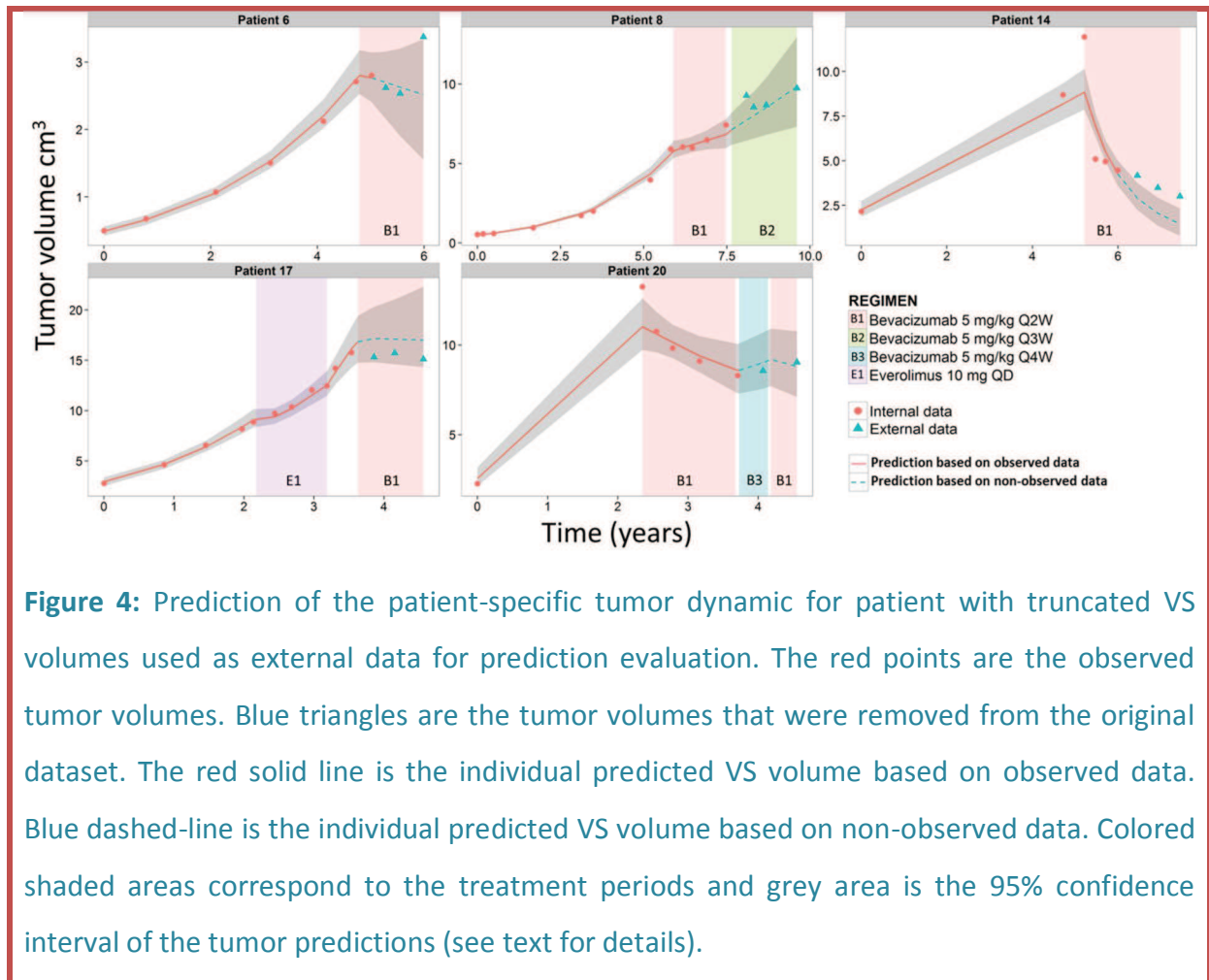
### ***Prediction of patient-specific tumor dynamic***

To assess its predictive capacities, the model was reused to analyze a dataset with truncated points for 5 patients of interest to perform predictions of patients-specific VS dynamics. Parameters estimated with this truncated dataset were very similar to the ones estimated from the original dataset as well as the goodness of fit plots. The individual predictions of the 5 patients are shown in the Fig. 4. For all the patients except patient 14, the external data (blue triangles) were included in the 95% confidence interval of the tumor dynamic (grey area). The model could correctly predict the tumor dynamic when a new dose was given (patients 8 and 20) but also when a different compound was administered (patient 17).

### **Discussion**

To our knowledge, we proposed the first mathematical model to describe VS natural growth and response to bevacizumab and/or everolimus treatment in NF2 patients.

We showed that VS are characterized by a two-speed growth that depends on tumor size ( $TS_{th} = 7 \text{ cm}^3$ ). This outcome might be explained by the anatomical context of the VS. The main origin of VS is the internal auditory canal[33] where small tumors (stage 1) seem to grow exclusively[34]. Then the tumor reaches the cerebellopontine angle (stage 2 to 4) which offers more space for the VS growth. When the tumor starts to compress the brainstem (stage 4 VS)[35] it might be possible that the VS becomes physically unable to keep the same growth rate because it does not have enough space for it.



The effect of space restriction was confirmed by a recent study that brought out the increase of the VS growth rate after resection of the contralateral tumor in patients with NF2[36]. This phenomenon is explained by the fact that when the largest tumor is removed, the compression on the brainstem is reduced and so allows the remaining VS to expand faster.

To account for drug effect, direct effect of the drugs in the Simeoni equation was tested for both bevacizumab and everolimus but individual fits and goodness of fit plots was worsened; in particular for patients treated with everolimus group, as these patients show tumor volume rebound after treatment cessation, which cannot be described with such types of model. As this phenomenon was considered highly important, we decided to keep

the mechanism-based model described in Fig. 1. This model provides more relevant information in this purpose and allows the use of a unique model that presents the particularity of having two different sites of action. A plausible mechanism responsible for the upregulation of tumor proliferation is the activation of the AKT protein due to mTORC1 inhibition[3, 37]. This protein, at the crossroads of many proto-oncogenes and tumor suppressors implied in cell signaling and metabolic regulation, has beneficial effects on tumor proliferation and survival[37, 38]. A deregulation of AKT signaling is able to provoke malignant transformation in different cell types[39]. It is worth pointing out that the model including the upregulation of the tumor proliferation due to the inhibition of mTORC1 by everolimus (red solide line Fig. 2a) is able to capture the rebound of the tumor growth after the end of everolimus therapy. Removing this feedback loop worsen the individual fits of everolimus patients (green dashed-line Fig. 2a) and decreases significantly the value of the BIC (10 points).

The model proposed is also more complex than classical tumor growth model used to analyze tumor volume clinical data. This complexity must be justified and show benefit with respect to more parsimonious model structures. For instance, an  $E_{MAX}$  model for the everolimus treated patients has been tested on the proliferation part of the tumor growth equation (Eq. 14) but lead to worsen the BIC criteria by 22 points. We claim that our mechanism-based hypothesis on the potential link between everolimus target and VEGF is supported by the fact that literature findings showed that mTORC1 acts on VEGF synthesis through HIF $\alpha$  protein activation under hypoxic conditions[5]. Increasing the number of patients is also critical to confirm the preliminary results.

We showed preliminary results on model's capabilities to predict, prospectively, tumor size dynamic. If validated, this strategy could be important for clinicians to predict potential effect of changing dosing regimen or switching from one drug to the other to maximize effect. For illustration, Patient 17 was initially treated by everolimus 10 mg QD (Fig. 4). The model could predict a stabilization of the tumor growth under bevacizumab 5 mg/kg Q2W. The  $K_{deg}$  parameter estimated thanks to the everolimus treated period could be reused to predict the VS dynamic under bevacizumab as the effect of this latter only depends on  $K_{deg}$  parameter. Patient 14 had a cyst associated to the VS that was drained by surgery explaining why the model is not able to describe or predict correctly the VS dynamic of this patient (Fig. 2a and 5). This patient can be seen as a negative control in terms of natural growth because of the atypical growth of his VS. However the model has correctly captured the future trend of the VS dynamic for all the patients with more or less precision. The presented results should be however taken with caution given the limited number of patients analyzed and should be extensively tested with an external dataset to assess robustness and validation.

As a perspective, efforts have to be made to use the model for dose adjustments and individualized therapy. Indeed, the work presented above has to be seen as a preliminary work that must be deepened in a large-scale population of patient with diverse dosing regimens. This is necessary if we want to refine the treatment dose and being able to simulate other bevacizumab dosing regimens accurately. The current state of this work does not allow reliable simulations of other dosing regimens.

Moreover this larger-scale analysis is also important to increase the confidence and the robustness of the individual predictions. This ultimate endpoint will help clinicians to predict the treatment efficacy and go towards surgery if a disease progression is likely to happen.

To conclude our study adequately describes the natural history of VS dynamics as well as peculiar behaviors observed under bevacizumab and everolimus. Moreover our preliminary results regarding individual prediction of the tumor growth look promising and open a perspective towards personalization of NF2 patients' treatment based on the early prediction of patient-specific tumor dynamics.

## **Acknowledgements**

The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° 115156, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' contribution in kind. The DDMoRe project is also supported by financial contributions from academic and SME partners. This work does not necessarily represent the view of all DDMoRe partners.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.



## **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The local institutional review board approved this retrospective chart review. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## References

1. Evans DGR, Huson SM, Donnai D, et al. (1992) A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. II. Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet* 29:847–852. doi: 10.1136/jmg.29.12.847
2. Blakeley JO, Evans DG, Adler J, et al. (2012) Consensus recommendations for current treatments and accelerating clinical trials for patients with neurofibromatosis type 2. *Am J Med Genet Part A* 158 A:24–41. doi: 10.1002/ajmg.a.34359
3. Chiang GG, Abraham RT (2007) Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13:433–442. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.001
4. Pópulo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13:1886–1918. doi: 10.3390/ijms13021886
5. Rini BI, Atkins MB (2009) Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 10:992–1000. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70240-2
6. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG, et al. (2009) Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med* 361:358–367. doi: 10.1056/NEJMoa0902579
7. Mautner V, Nguyen R, Kutta H, et al. (2010) Bevacizumab induces regression of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol* 12:14–8. doi: 10.1093/neuonc/nop010
8. Alanin MC, Klausen C, Caye-Thomasen P, et al. (2014) The effect of bevacizumab on vestibular schwannoma tumour size and hearing in patients with neurofibromatosis type 2. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. doi: 10.1007/s00405-014-3398-3
9. Farschtschi S, Kollmann P, Dalchow C, et al. (2015) Reduced dosage of bevacizumab in treatment of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. doi: 10.1007/s00405-015-3604-y
10. Goutagny S, Raymond E, Esposito-Farese M, et al. (2015) Phase II study of mTORC1 inhibition by everolimus in neurofibromatosis type 2 patients with growing vestibular schwannomas. *J Neurooncol* 122:313–320. doi: 10.1007/s11060-014-1710-0
11. Karajannis M a., Legault G, Hagiwara M, et al. (2014) Phase II study of everolimus in children and adults with neurofibromatosis type 2 and progressive vestibular schwannomas. *Neuro Oncol* 16:292–297. doi: 10.1093/neuonc/not150
12. Goutagny S, Bouccara D, Bozorg-Grayeli a., et al. (2007) La neurofibromatose de type 2. *Rev Neurol (Paris)* 163:765–777. doi: 10.1016/S0035-3787(07)91459-9
13. Plotkin SR, Halpin C, Blakeley JO, et al. (2009) Suggested response criteria for phase II antitumor drug studies for neurofibromatosis type 2 related vestibular schwannoma. *J Neurooncol* 93:61–67. doi: 10.1007/s11060-009-9867-7
14. Buil-Bruna N, Sahota T, Lopez-Picazo J-M, et al. (2015) Early Prediction of Disease Progression in Small Cell Lung Cancer: Toward Model-Based Personalized Medicine in Oncology. *Cancer Res* 75:2416–2425. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2584

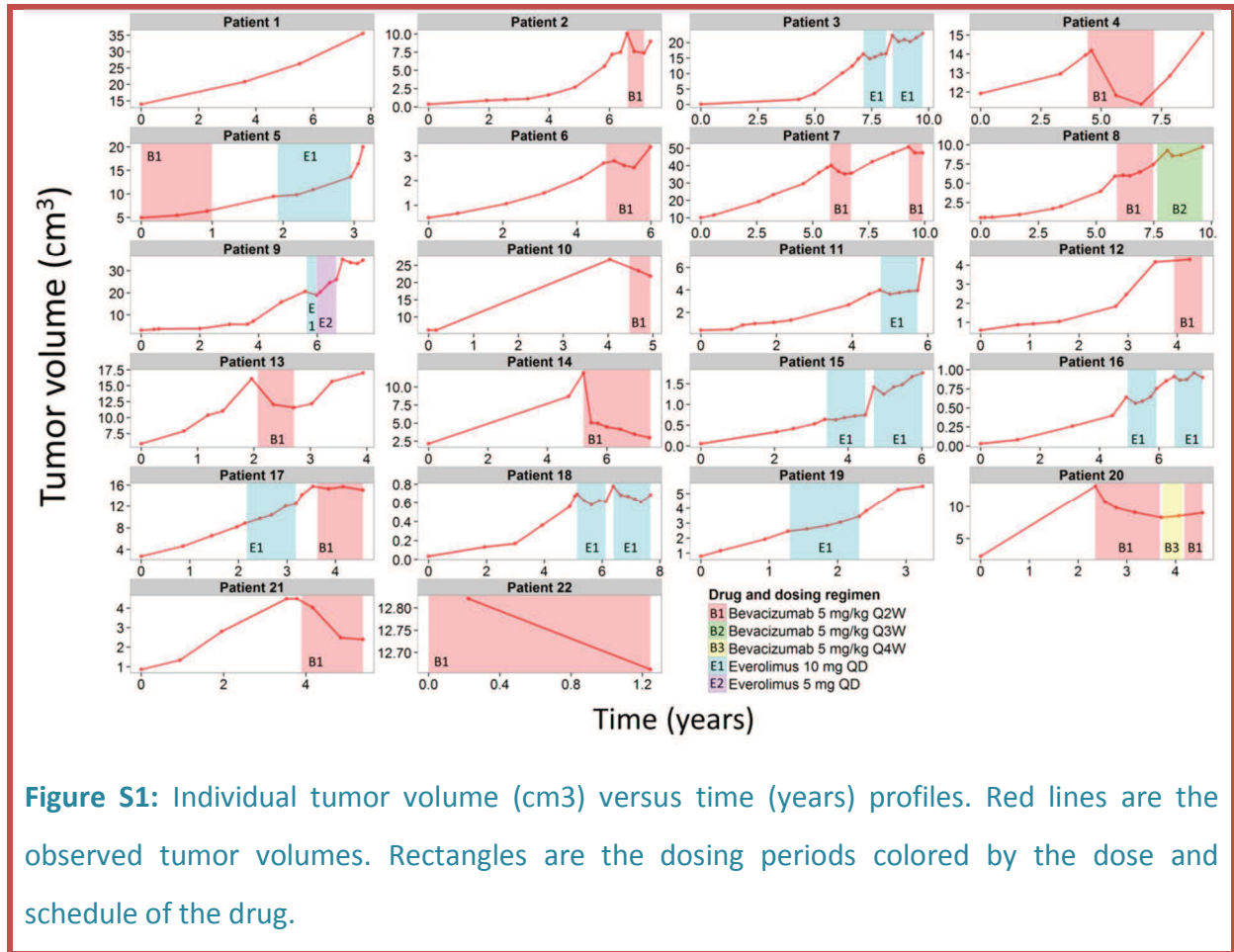
15. Mazzocco P, Barthélémy C, Kaloshi G, et al. (2015) Prediction of Response to Temozolomide in Low-Grade Glioma Patients Based on Tumor Size Dynamics and Genetic Characteristics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. doi: 10.1002/psp4.54
16. Lindstrom MJ, Bates DM, Lindstrom MJ (1990) Nonlinear Mixed Effects Models for Repeated Measures Data. *Biometrics* 46:673–687.
17. Mould DR, Upton RN (2013) Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2:e38. doi: 10.1038/psp.2013.14
18. Ribba B, Holford NH, Magni P, et al. (2014) A review of mixed-effects models of tumor growth and effects of anticancer drug treatment used in population analysis. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol* 3:e113. doi: 10.1038/psp.2014.12
19. Bauer RJ (2011) NONMEM users guide: Introduction to NONMEM 7.2.0. ICON Development Solutions Ellicott City, Maryland.
20. Simeoni M, Magni P, Cammia C, et al. (2004) Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res* 64:1094–101.
21. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, et al. (2000) Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 6:405–13. doi: 10.1038/74664
22. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P (2004) VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays* 26:943–954. doi: 10.1002/bies.20092
23. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P (2009) Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* 89:607–648. doi: 10.1152/physrev.00031.2008
24. Caye-Thomasen P, Baandrup L, Jacobsen GK, et al. (2003) Immunohistochemical demonstration of vascular endothelial growth factor in vestibular schwannomas correlates to tumor growth rate. *Laryngoscope* 113:2129–2134. doi: 10.1097/00005537-200312000-00014
25. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, et al. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28:131–138.
26. Lu J-F, Bruno R, Eppler S, et al. (2008) Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 62:779–786. doi: 10.1007/s00280-007-0664-8
27. Panoilia E, Schindler E, Samantas E, et al. (2015) A pharmacokinetic binding model for bevacizumab and VEGF165 in colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 75:791–803. doi: 10.1007/s00280-015-2701-3
28. Roche (2014) Avastin Data Sheet.
29. Ballou LM, Lin RZ (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol* 1:27–36. doi: 10.1007/s12154-008-0003-5
30. FDA (2008) Everolimus Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s).

31. Lane H a., Wood JM, McSheehy PMJ, et al. (2009) mTOR Inhibitor RAD001 (Everolimus) Has Antiangiogenic/Vascular Properties Distinct from a VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Cancer Res* 15:1612–1622. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2057
32. Ouerdani A, Struemper H, Suttle AB, et al. (2015) Preclinical Modeling of Tumor Growth and Angiogenesis Inhibition to Describe Pazopanib Clinical Effects in Renal Cell Carcinoma. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol*. doi: 10.1002/psp4.12001
33. Barbara M, Ronchetti F, Manni V, Monini S (2008) Double localization of a unilateral sporadic vestibular schwannoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 28:34–7.
34. Tryggvason G, Barnett A, Kim J, et al. (2012) Radiographic association of schwannomas with sensory ganglia. *Otol Neurotol* 33:1276–1282. doi: 10.1097/MAO.0b013e318263d315.Radiographic
35. Bozorg Grayeli A, Ferrary E, Tubach FI, et al. (2015) Effect of Corticosteroids on Facial Function after Cerebellopontine Angle Tumor Removal: A Double-Blind Study versus Placebo. *Audiol Neurotol* 20:2013–221. doi: 10.1159/000370191
36. Peyre M, Goutagny S, Imbeaud S, et al. (2011) Increased growth rate of vestibular schwannoma after resection of contralateral tumor in neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol* 13:1125–32. doi: 10.1093/neuonc/nor101
37. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B (2006) mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. *Cancer Res* 66:1500–1508. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925
38. Altomare D a, Testa JR (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24:7455–7464. doi: 10.1038/sj.onc.1209085
39. Miller C, Sudhoff H, Jacob A (2014) Vestibular Schwannoma Drug Development: Current State-of-the Art. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 2:217–225. doi: 10.1007/s40136-014-0063-8

## Supplementary material

Bevacizumab pharmacokinetic parameters (units)	Typical values	Ref.
$V_1$ (L)	2.66	
$V_2$ (L)	2.78	26
Q (L/month)	18.09	
CL (L/month)	6.49	
Parameters of the TMDD model (units)	Typical values	Ref.
$VEGF_{u,0}$ (nM)	0.0053	
$k_{SS}$ (nM)	267	27
$k_{in}$ (nM/month)	0.065	
$k_{out}$ (/month)	12.23	
$CL_{RC}$ (L/month)	6.49	
Everolimus pharmacokinetic parameters (units)	Typical values	Ref.
$k_a$ (/month)	4443	
$k_{12}$ (/month)	177	30
$k_{21}$ (/month)	65	
$k$ (/month)	72	
V (L)	191	

**Table S1:** Pharmacokinetics parameters of the bevacizumab, everolimus and TMDD model taken from literature.



**Figure S1:** Individual tumor volume (cm<sup>3</sup>) versus time (years) profiles. Red lines are the observed tumor volumes. Rectangles are the dosing periods colored by the dose and schedule of the drug.

## Appendix

### NONMEM input file

```

$PROBLEM          ; Final Model

$INPUT            ID TIME DOSE=AMT DV=DROP LDV=DV BCDV=DROP FLAG
                  CMT ADDL II MDV EVID EAR DRUG ST STADE K12B K21B
                  KB  VB  KA=DROP  K12E=DROP  K21E=DROP  KE=DROP
                  VE=DROP TIME2 DR=DROP DP=DROP PR=DROP SD=DROP
                  TDP MNTS MDTs MNDV=DROP MDDV=DROP CLASSDP AD SEX
                  AS AST MG OT FAM MUT AD2 AS2 AST2 TS0 TS02
                  ISTADE IAUD TSTADE TAUD=DROP GRP BEVA EVER
                  FLAGS1 FLAGS2 CEVES

$DATA             NM_RV10c.csv
                  IGNORE=@
                  IGNORE = (FLAG.GT.1)

$SUBROUTINES      ADVAN13 TOL=6

$MODEL            COMP = CENTRALB
                  COMP = PERIPHB
                  COMP = CELLS
                  COMP = VEGF
                  COMP = EPATH1
                  COMP = EPATH2
                  COMP = EPATH3
                  COMP = EPATH4

$PK

; ##### FIXED PK & PD parameters #####

; BEVACIZUMAB + TMDD

; PK parameters for Bevacizumab from Lu J-F, et al. 2008

          VBEV      =  VB
          QBEV      =  K12B*VB
          VBEV2     =  QBEV/K21B
          CL        =  KB*VB
          CLRC      =  CL

; Parameters for QSS-TMDD model from Panoilia, et al. 2015

```

```

        KOUT      = 0.401*30.5
        VEGF0     = 0.0053
        KSS       = 267
        KIN       = VEGF0*KOUT

; Basal levels of MTOR and Signals that stimulates the VS
proliferation

        MTOR0    = 1
        EPATH0   = 1

; ##### Parameters to be estimated #####

; Tumor growth parameters

; Exponential growth rate: LAMBDA0

        LTVLAMBDA0 = THETA(1)
        TVLAMBDA0  = EXP(THETA(1))
        MU_1       = LTVLAMBDA0
        LAMBDA0    = EXP(MU_1 + ETA(1))

; Linear growth rate: LAMBDA1

        LTVLAMBDA1 = THETA(2)
        TVLAMBDA1  = EXP(THETA(2))
        MU_2       = LTVLAMBDA1
        LAMBDA1    = EXP(MU_2 + ETA(2))

; Initial tumor size for each initial disease stage: P0

        IF(ISTADE.EQ.1) P0ISTADE = THETA(3)
        IF(ISTADE.EQ.2) P0ISTADE = THETA(4)
        IF(ISTADE.EQ.3) P0ISTADE = THETA(5)
        IF(ISTADE.EQ.4) P0ISTADE = THETA(6)
        P0COV       =P0ISTADE
        LTVP0       = P0COV
        TVP0        = EXP(P0COV)
        MU_3        = LTVP0
        P0          = EXP(MU_3 + ETA(3))

; Tumor death parameter: KDEG

        LTVKDEG    = THETA(7)
        TVKDEG     = EXP(THETA(7))
        MU_4        = LTVKDEG
        KDEG       = EXP(MU_4 + ETA(4))
    
```



```
; Concentration of Everolimus reducing 50% of MTOR level:
IC50
```

```
LTVIC50      = THETA(8)
TVIC50       = EXP(THETA(8))
MU_5         = LTVIC50
IC50         = EXP(MU_5 + ETA(5))
```

```
; ##### Initial conditions of the ODEs #####
```

```
A_0(3)      = P0
A_0(4)      = VEGF0
A_0(5)      = EPATH0
A_0(6)      = EPATH0
A_0(7)      = EPATH0
A_0(8)      = EPATH0
```

```
$DES
```

```
; ##### Bevacizumab effects: Quasi Steady-State TMDD model #####
```

```
; Bevacizumab concentrations
```

```
; Free Bevacizumab concentration: C
```

$$C = 1/2 * ( ( A(1) - A(4) - KSS ) + ( (A(1) - A(4) - KSS)**2 + 4*KSS*A(1) )**0.5 )$$

```
; Total Bevacizumab concentration: A(1)
```

$$DADT(1) = ( (QBEV/VBEV2) * A(2) ) / VBEV - ( CL/VBEV + QBEV/VBEV ) * C - ( ( A(4) * (CLRC/VBEV) * C ) / ( KSS + C ) )$$

```
; Peripheral Bevacizumab concentration: A(2)
```

$$DADT(2) = (QBEV/VBEV) * C * VBEV - ( (QBEV/VBEV2) * A(2) )$$

```
; VEGF concentrations
```

```
; Total VEGF concentration: A(4)
```

$$DADT(4) = KIN * MTOR - KOUT*A(4) - ( CLRC / VBEV - KOUT ) * ( (A(4)*C) / ( KSS + C ) )$$

```
; Free VEGF concentration: FVEGF
```

```

FVEGF = A(4) - TVEGF
; Concentration of the complex Bevacizumab-VEGF: TVEGF
TVEGF = A(4)*C / ( KSS + C )

; ##### Everolimus effects: MTOR Levels and signaling pathway #####
; Everolimus concentration: CEVE
CEVE = CEVES ; CEVES is the Steady-State trough
concentration of everolimus
; MTORC1 level: MTOR
MTOR = IC50 / (IC50 + CEVE)
; Signaling pathway leading to delayed overstimulation of tumor
proliferation
DADT(5) = ( MTOR0 / MTOR ) - A(5)
DADT(6) = ( A(5) - A(6) )
DADT(7) = ( A(6) - A(7) )
DADT(8) = ( A(7) - A(8) ) ; A(8) is the final signal
overstimulating the tumor proliferation

; ##### Tumor dynamic model #####
; Tumor volume: A(3)
DADT(3) = (LAMBDA0*A(3)) /
(1+((LAMBDA0/LAMBDA1)*A(3))**20)**(1/20) * A(8) - (1 -
FVEGF/VEGF0) * KDEG * A(3)

; ##### Renaming the different compartment #####
A1 = A(1)
A2 = A(2)
A3 = A(3)
A4 = A(4)
A5 = A(5)
A6 = A(6)
A7 = A(7)
A8 = A(8)

```

```
$ERROR (OBSERVATION ONLY)
```

```
IF (A(3).LT.1) IPRED=0.001
IPRED= LOG(A(3)*1000)
W=THETA(9)
Y = IPRED + W*EPS(1)
IRES = DV - IPRED
IWRES = IRES/W
```

```
$THETA
```

```
(-3.09)          ; LAMBDA0
(-1.26)          ; LAMBDA1
(-2.95)          ; P0ISTADE1
(-0.614)         ; P0ISTADE2
(1.25)           ; P0ISTADE3
(2.44)           ; P0ISTADE4
(-2.54)          ; KDEG
(2.49)           ; IC50
(0, 0.118)       ; ERR1_prop
```

```
$OMEGA
```

```
0.0919          ; OM_LAMBDA0
1.41             ; OM_LAMBDA1
0.134           ; OM_P0
0.16 FIX        ; OM_KDEG
0.0225 FIX      ; OM_IC50
```

```
$SIGMA
```

```
1 FIX           ;EPS1 set to 1
```

```
$ESTIMATION METHOD=SAEM INTERACTION PRINT=10 NBURN=2500 NITER=500
CTYPE=3 CITER=10 CINTERVAL=50 CALPHA=0.05 ISAMPLE=2 GRD=DDDDDDDD
RANMETHOD=3S NOABORT CONSTRAIN=0
```

```
$ESTIMATION METHOD=IMP INTERACTION EONLY=1 PRINT=1 NITER=10
ISAMPLE=1000 MAPITER=0 CTYPE=3 RANMETHOD=3S NOABORT
```

```
$COVARIANCE PRINT=E MATRIX=R UNCONDITIONAL
```

## II- Complément d'article

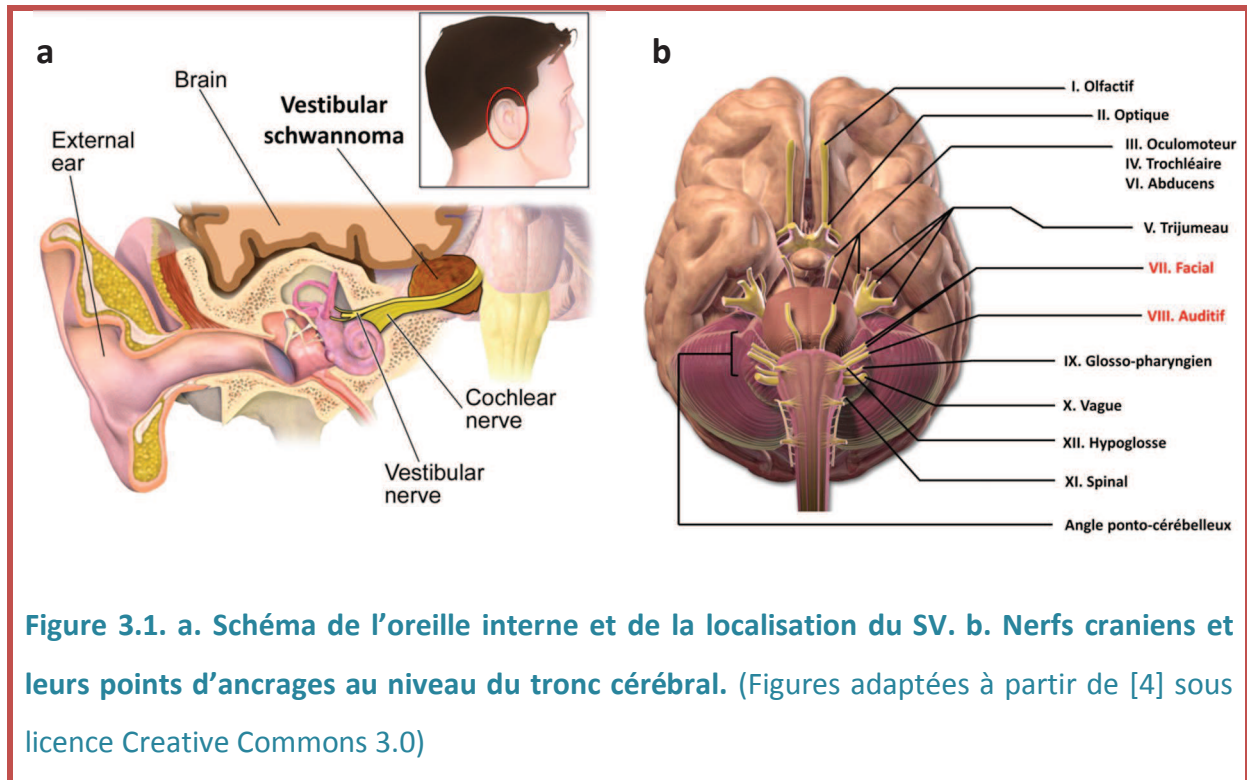
### A. Contexte général

La neurofibromatose de type 2 (NF2) est une maladie autosomale dominante caractérisée par le développement de multiples tumeurs bénignes au niveau du système nerveux central et périphérique. Elle est due à une mutation bi-allélique du gène NF2 qui code pour une protéine appelée merline. La perte de fonction de ce suppresseur de tumeur aboutit à la perte de contrôle de l'inhibition contact-dépendante de la prolifération des cellules de Schwann. Le Schwannome vestibulaire (SV) bilatéral est la principale manifestation de la NF2 et celle qui provoque les atteintes les plus graves comme une surdité totale irréversible, une paralysie faciale ou même dans de rares cas la mort [1].

Un SV est une tumeur bénigne touchant les cellules de Schwann qui constituent la gaine de myéline des axones des neurones composant le nerf vestibulaire. Ces tumeurs naissent au niveau du conduit auditif interne et atteignent l'angle ponto-cérébelleux (APC) lors de leur croissance (Figure 3.1.a). Les SV représentent 8% des tumeurs intracrâniennes et 80% à 90% des tumeurs de l'APC [2, 3]. L'APC est le point d'ancrage de nombreux nerfs crâniens notamment le nerf auditif et le nerf facial (Figure 3.1.b). Ces tumeurs sont classées en quatre stades en fonction de la taille de la tumeur dans l'APC :

- Stade 1 : la tumeur se situe dans le conduit auditif uniquement
- Stade 2 : moins de 15mm de la tumeur se trouve dans l'APC
- Stade 3 : entre 15 et 30mm de la tumeur se trouve dans l'APC

- Stade 4 : plus de 30mm de la tumeur se trouve dans l'APC



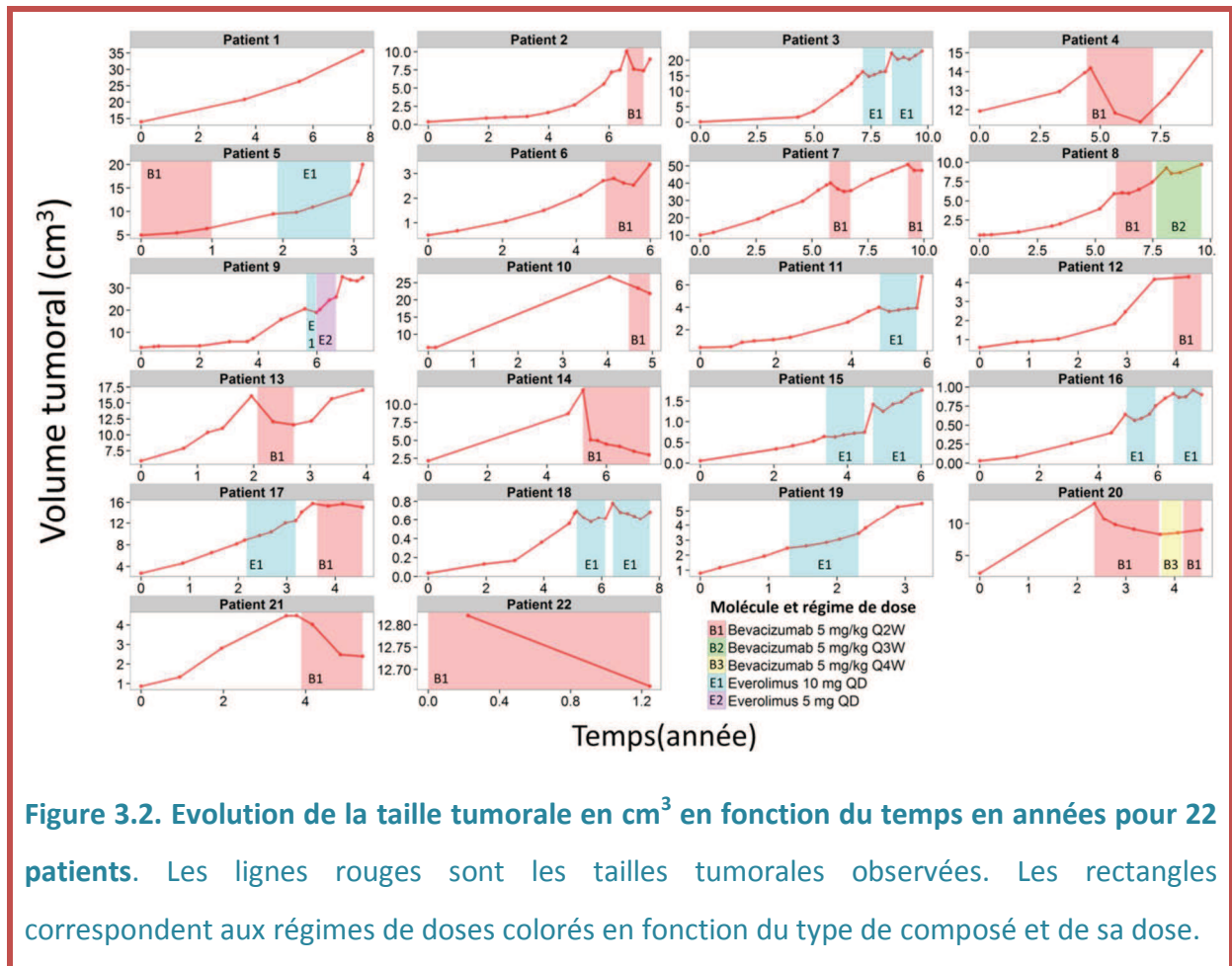
Les conséquences d'une compression chronique de cette zone sont désastreuses puisqu'elles aboutissent à une perte définitive des fonctions nerveuses. Le retrait de la tumeur par chirurgie n'est pas la meilleure solution car la procédure a de grands risques de sacrifier le nerf auditif et/ou le nerf facial, ces risques augmentant avec la taille de la tumeur. Cependant, une prise en charge devient nécessaire lorsque les symptômes s'aggravent ou lorsque la croissance tumorale s'accélère.

Par conséquent, les cliniciens s'intéressent de plus en plus à des traitements médicamenteux ayant pour objectif de ralentir et de contrôler la croissance des SV. Nous pouvons notamment citer le bevacizumab et l'everolimus qui ont été le sujet de nombreuses études et essais cliniques pour le traitement des SV [5–10]. Dans notre étude rétrospective, nous nous intéressons également à l'analyse de la croissance de SV chez des patients traités par bevacizumab ou everolimus.

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui cible le VEGF et neutralise ainsi son activité biologique sur l'angiogenèse tumorale (voir chapitre 1, section I). Ce médicament a été approuvé pour le traitement de nombreuses tumeurs solides (cancer colorectal métastatique, carcinome rénal métastatique, cancer du poumon non à petites cellules métastatique, etc.) en combinaison avec des agents cytotoxiques selon l'indication [11].

L'everolimus est un inhibiteur de la protéine mTOR, une kinase à la croisée de diverses voies de signalisations impliquées dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse [12–14]. Cette protéine est retrouvée dans deux différents complexes protéiques, mTORC1 et mTORC2, et seul le premier complexe est sensible à l'everolimus [15]. La molécule a été approuvée pour le traitement du carcinome rénal avancé, du cancer du sein avancé et des tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique [16].

Par conséquent, le bevacizumab et l'everolimus sont des agents cytostatiques qui, par leurs mécanismes d'action respectifs, vont ralentir la croissance tumorale. Pourtant dans notre étude, lorsque nous regardons les dynamiques tumorales sous bevacizumab et everolimus, les effets ne se limitent pas uniquement au ralentissement de la croissance tumorale (figure 3.2). Pour les patients traités par bevacizumab, nous observons dans la plupart des cas une réduction franche et instantanée de la taille des SV tandis que la croissance reprend normalement après l'arrêt du traitement. En ce qui concerne les patients sous everolimus, le traitement ralentit la croissance tumorale. De plus, nous pouvons observer un rebond de la prolifération tumorale après l'arrêt du traitement chez la plupart des patients traités par everolimus (figure 3.2). Ainsi, les deux molécules présentent des effets distincts sur la dynamique des SV.



La construction d'un modèle non-linéaire à effets-mixtes basé sur les mécanismes d'action des deux molécules est une approche pertinente dans ce cas. En effet nous disposons d'une littérature bien fournie sur les mécanismes d'action du bevacizumab et de l'everolimus, mais aussi sur les interactions entre le VEGF, cible directe ou indirecte des deux traitements, et les cellules de Schwann. Cette littérature va nous aider à potentiellement expliquer les dynamiques observées. En intégrant toutes ces informations dans un modèle, il sera possible de tester différentes hypothèses quant aux mécanismes responsables de ces croissances tumorales, et ainsi décrire de façon adéquate les allures spécifiques à chacun des traitements. C'est ce que nous verrons plus précisément dans la partie construction du modèle.

## B. Objectifs

Notre étude se concentre sur trois objectifs.

Comme nous avons la chance d'avoir des tailles de SV sans traitement, notre objectif premier est de caractériser l'histoire naturelle de la croissance des SV. Ce sera la première étude quantitative pour la croissance naturelle des SV. En comprenant comment les SV croissent naturellement, il sera plus simple d'identifier les effets dus aux traitements.

Notre deuxième objectif est de savoir si les hypothèses de la littérature nous permettent d'expliquer les dynamiques tumorales que nous observons, comme la décroissance instantanée observée dès l'administration de bevacizumab, et le rebond de la prolifération tumorale qui fait suite à l'arrêt du traitement par l'everolimus. Pour cela nous avons fait le choix de développer un modèle non-linéaire à effets-mixtes qui est basé sur les mécanismes d'action de la maladie et des deux traitements décrits précédemment dans la littérature.

Enfin, un dernier point important concerne l'adaptation de la thérapie pour chaque patient. Comme nous l'avons décrit plus haut, le but de la stratégie thérapeutique est de ralentir la croissance tumorale à l'aide d'un traitement médicamenteux. Cependant il se peut que, pour des raisons de toxicité ou à cause de l'aggravation des symptômes, les régimes de doses soient modifiés ou que la chirurgie soit avancée afin de maximiser les chances de préserver les fonctions nerveuses. La prédiction de la dynamique tumorale sous traitement, pour un patient particulier, constitue une approche intéressante d'un point de vue clinique. En effet, en ayant une idée de l'évolution tumorale à venir il sera possible d'orienter la prise



en charge du SV précocement et de façon individuelle. Par conséquent nous nous intéresserons particulièrement aux capacités prédictives de notre *modèle* final.

## C. Démarche de construction du modèle mécanistique

Au cours de cette partie, nous allons présenter le raisonnement et les étapes qui nous ont permis d'aboutir au *modèle* final. Pour éviter toute redondance, nous ne détaillerons pas les équations puisqu'elles ont été précédemment décrites dans la publication située partie I de ce chapitre.

### 1. Brève description des données

Notre étude rétrospective porte sur des données longitudinales de tailles tumorales pour 22 patients atteints de NF2. 13 d'entre eux ont été traités par une perfusion de bevacizumab à une dose de 5 mg/kg toutes les deux semaines (Q2W), sept patients ont reçu 10 mg d'everolimus par voie orale une fois par jour (QD) et deux patients ont bénéficié des deux traitements. En fonction de la tolérance aux médicaments, la dose d'étude est réduite à 5 mg/kg toutes les trois (Q3W) ou quatre semaines (Q4W) pour le bevacizumab et 5 mg QD pour l'everolimus. Enfin, en cas de chirurgie (d'une des autres tumeurs bénignes dues à la NF2) le traitement est arrêté un mois avant et un mois après la procédure. La figure 3.2 montre les dynamiques tumorales pour chaque patient.

## 2. Modélisation de la croissance tumorale non traitée

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la modélisation de la croissance des SV non traités. Pour cela, nous avons réalisé un "screening" de modèles de complexité croissante. Sur la base des critères d'évaluation, le modèle de croissance tumorale finalement retenu est celui développé par Simeoni et collègues [17]. Les résultats de la modélisation des données prétraitements sont présentés dans les tableaux 3.1 et 3.2.

Modèle	BIC	$\Delta$ BIC	NP
Simeoni	- 147	0	10
Croissance logistique	- 141	+ 6	10
Croissance exponentielle	- 140	+ 7	8
Croissance logistique avec capacité de charge	- 136	+ 11	10
Croissance de Gompertz	- 131	+ 16	12
Croissance linéaire	- 10	+ 137	8

**Tableau 3.1. Comparaison des scores Bayésiens (BIC) pour différents modèles de croissance tumorale.**  $\Delta$ BIC représente la différence de BIC par rapport au modèle final (Simeoni). NP est le nombre de paramètres estimés pour chaque modèle (variabilités interindividuelles et erreur résiduelle comprises)

Nous avons utilisé le stade tumoral initial comme covariable de la taille tumorale initiale  $TS_0$  puisque celle-ci présente une très grande variabilité (valeur médiane de  $1,5 \text{ cm}^3$  avec un minimum à  $0,03 \text{ cm}^3$  et un maximum  $14 \text{ cm}^3$ ). C'est pour cela que nous observons quatre valeurs de  $TS_0$  dans le tableau 3.2.

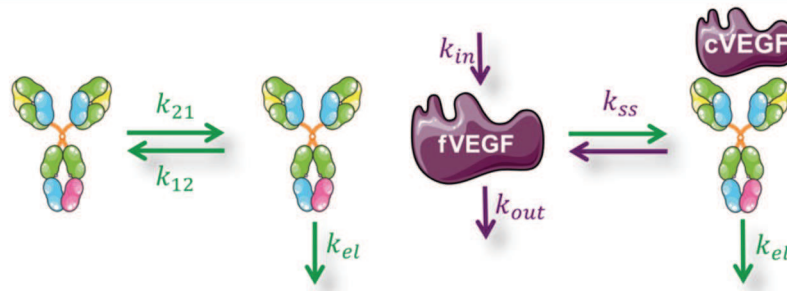
Paramètres (Unité)	Estimation (rse%)	IIV % (RSE%)	Shrinkage %
$\lambda_0$ (month <sup>-1</sup> )	0.042 (8)	28 (20)	25
$\lambda_1$ (cm <sup>3</sup> /month)	0.34 (34)	77 (42)	4
Stade 1 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	0.053 (20)		
Stade 2 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	0.55 (15)		
Stade 3 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	3.31 (16)	37 (17)	37
Stade 4 TS <sub>0</sub> (cm <sup>3</sup> )	11 (34)		
$\epsilon$ (%)	39 (6)		16

**Tableau 3.2. Valeurs des paramètres estimés du modèle pour les dynamiques tumorales sans traitement.**  $\lambda_0$  et  $\lambda_1$  sont respectivement les constantes de vitesse exponentielle et linéaire. TS<sub>0</sub> est la taille tumorale au début de l'étude pour un stade 1, 2, 3 ou 4. La variabilité inter-individuelle (IIV) est présentée en écart-type (racine carrée de la variance estimée par NONMEM) et est exprimée en pourcent tout comme les "residual standard error". Un modèle d'erreur résiduel additif en échelle logarithmique a été utilisé.  $\epsilon$  est exprimé en écart-type (racine carrée de la variance estimée par NONMEM).

### 3. Modélisation des effets du Bevacizumab

Comme nous l'avons rapidement évoqué précédemment, les patients traités par le bevacizumab montrent une réduction tumorale significative qui apparaît dès lors que le traitement est administré (figure 3.2). Cette réponse au traitement est intrigante puisqu'on attend du bevacizumab qu'il réduise d'abord la vascularisation tumorale dont la conséquence ultérieure est une diminution de la taille tumorale. Or, comme nous l'avons vu lors du chapitre précédent, ce processus prend du temps et un délai est normalement

observé entre l'administration du médicament anti-angiogénique et la réduction tumorale. De ce fait, nous n'envisageons pas de modéliser le processus d'angiogenèse tumorale comme nous l'avons fait pour le pazopanib. Sachant que le bevacizumab cible exclusivement le VEGF, nous avons décidé d'investiguer les effets de cette protéine sur les cellules de Schwann. De nombreuses études ont démontré que le VEGF, bien que principalement connu pour son rôle dans l'angiogenèse, avait aussi une fonction neuroprotectrice [18, 19]. Ce dernier exerce des effets sur la plupart des cellules du système nerveux comme les neurones ou les astrocytes, mais aussi sur les cellules de Schwann. La fixation du VEGF sur les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 présents au niveau des cellules de Schwann aboutit à la stimulation de la prolifération et de la migration cellulaire et contribue à la protection des cellules contre l'apoptose induite par l'hypoxie [20]. Cette dernière fonction est très importante dans la mesure où elle permettrait d'expliquer pourquoi une réduction tumorale est observée immédiatement après l'administration du traitement. En effet, en se liant au VEGF, le bevacizumab sensibilise les cellules de Schwann à l'hypoxie avec pour conséquence la mort cellulaire par apoptose. Parallèlement à cela, la vascularisation tumorale se dégrade et plonge le SV en hypoxie. Pour modéliser les effets du bevacizumab, nous avons utilisé un modèle QSS-TMDD récemment publié [21] (voir chapitre 1, section II.B1.b). Les paramètres de population ont servi à simuler des concentrations de bevacizumab et de VEGF que nous ne possédons pas. Ce modèle indique que le bevacizumab, qui se distribue selon deux compartiments pharmacocinétiques, se lie au VEGF pour former un complexe. L'anticorps seul ainsi que le complexe sont ensuite éliminés du compartiment central (figure 3.3).



**Figure 3.3. Représentation schématique du modèle "target-mediated drug disposition" quasi-stationnaire tel que décrit dans Panoilla et al. 2015 [21].** L'anticorps représente le bevacizumab.  $k_{12}$  et  $k_{21}$  sont les constantes de vitesses de transfert entre le compartiment central et périphérique.  $k_{el}$  est la constante de vitesse d'élimination du bevacizumab et du complexe bevacizumab/VEGF. Le fVEGF est le VEGF libre circulant. Il est synthétisé selon une constante de vitesse d'ordre 0  $k_{in}$  et est éliminé selon une constante de vitesse d'ordre 1  $k_{out}$ .  $k_{ss}$  est la constante de vitesse de formation et de dissociation du complexe bevacizumab/VEGF. Enfin, le cVEGF représente le VEGF complexé au bevacizumab.

#### 4. Modélisation des effets de l'everolimus

Nous avons utilisé un modèle pharmacocinétique à deux compartiments avec une absorption et une élimination linéaire de premier ordre pour simuler les concentrations d'everolimus [22]. Nous savons que l'everolimus inhibe le complexe mTORC1. Afin de modéliser cette inhibition, nous supposons que le niveau basal de mTORC1 en absence d'everolimus est égal à 1. Pour réduire ce niveau basal sous everolimus, nous avons utilisé un modèle  $I_{MAX}$ . Cela revient au même que d'utiliser un modèle de réponse indirecte où les constantes  $k_{in}$  et  $k_{out}$  sont toutes deux égales à 1.

L'étape suivante consiste à modéliser les interactions entre le complexe mTORC1, cible de l'everolimus, et ses cibles potentielles à savoir la tumeur et/ou le VEGF. Plusieurs options s'offrent à nous, comme l'illustre la figure 3.4. En effet, nous avons évoqué

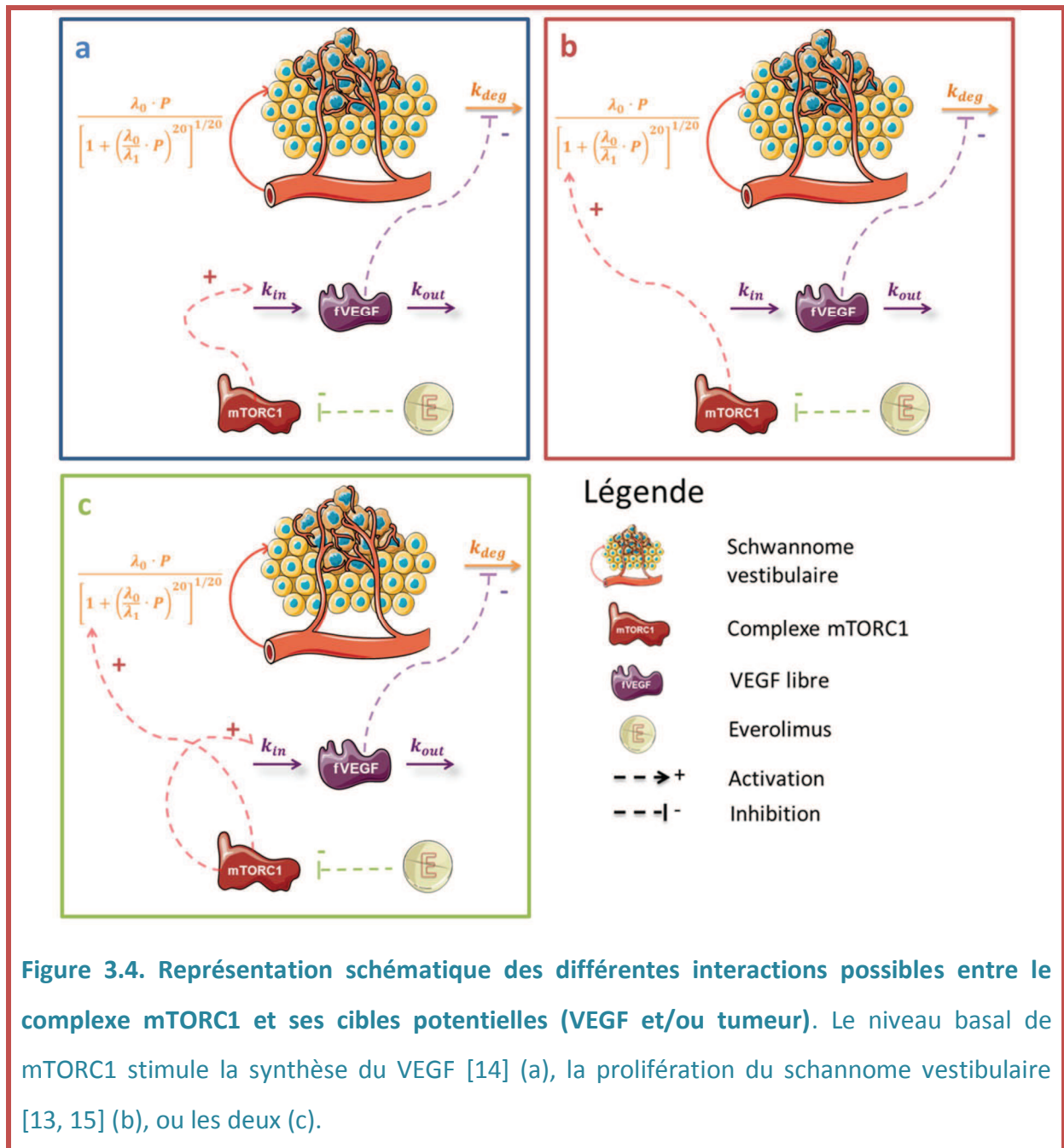
précédemment que le complexe mTORC1 était au cœur d'une multitude de voies de signalisation qui mènent principalement à la prolifération et la survie cellulaire ainsi qu'à l'angiogenèse.

De ce fait, nous avons décidé de tester la stimulation par le complexe mTORC1 :

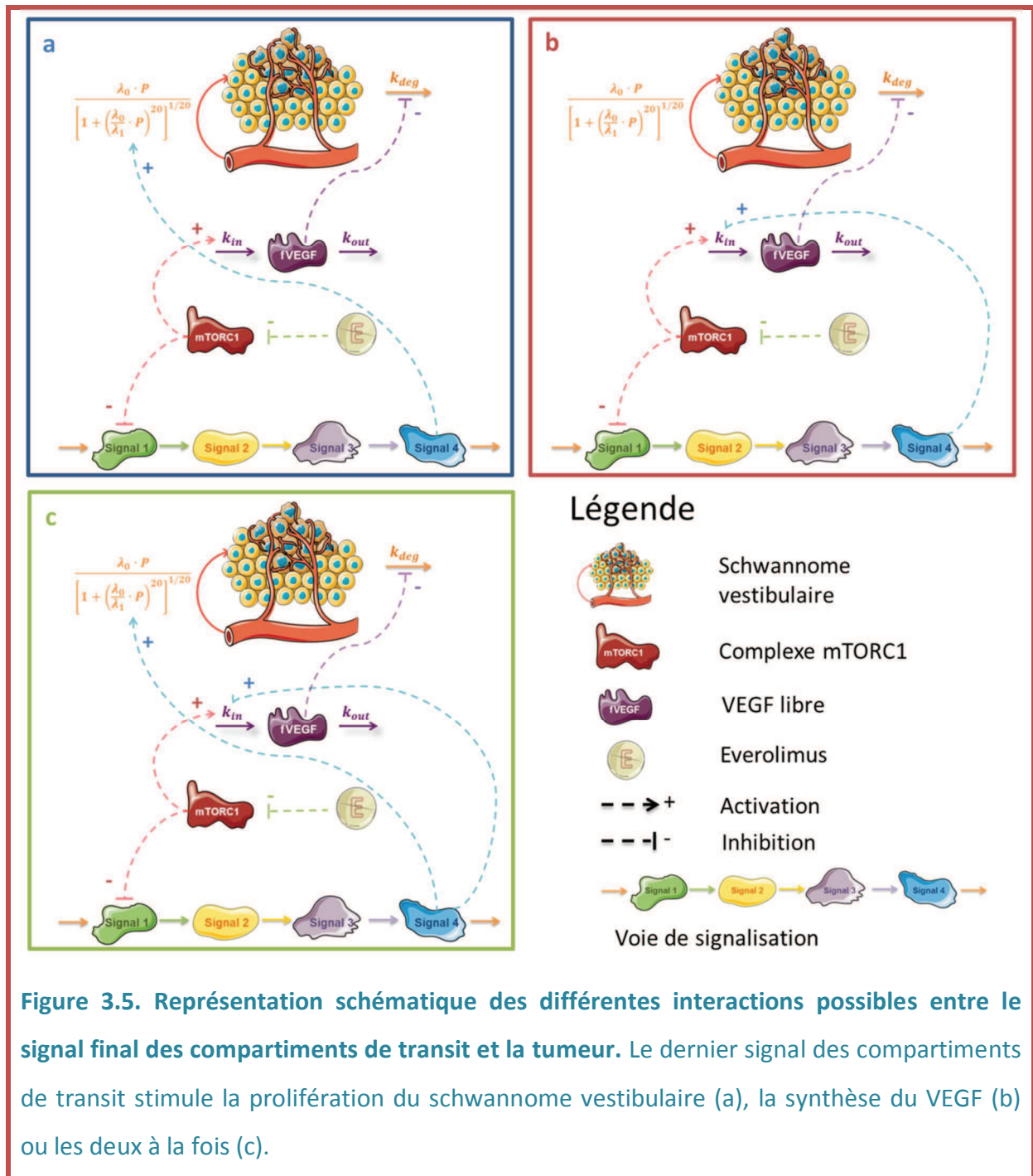
- de la synthèse de VEGF (figure 3.4.a).
- de la prolifération du SV (figure 3.4.b)
- ou des deux simultanément (figure 3.4.c).

Sur la base des critères statistiques et des graphiques diagnostics (cf. Annexe en fin de manuscrit), le modèle d'interaction finalement retenu est celui où le complexe mTORC1 stimule la synthèse de VEGF (figure 3.4.a).

Cependant, le modèle présenté figure 3.4.a ne permet de décrire correctement les données. En effet il ne capture pas le sursaut de la croissance tumorale que l'on observe à l'arrêt du traitement. Il est nécessaire d'ajouter un processus qui permet de retarder la stimulation de la prolifération du SV. Par conséquent, afin de modéliser le rebond, un ensemble de compartiments de transit est ajouté au modèle présenté figure 3.4.a. Ici aussi trois choix d'interactions sont possibles comme le montre la figure 3.5. Dans les trois cas l'inhibition du complexe mTORC1 mène à la perte d'inhibition de la cascade de signalisation représentée par les quatre compartiments de transit. Chacun des quatre signaux est à un état basal de 1 lorsque le complexe mTORC1 est lui aussi à un niveau basal de 1. Ces signaux vont évoluer de façon inversement proportionnel au niveau de mTORC1.



Autrement dit, lorsque le niveau de mTORC1 descend en dessous de 1 sous l'effet de l'everolimus, les signaux eux vont passer au-dessus de 1 pour finalement accroître la prolifération tumorale et/ou la synthèse de VEGF en fonction du *modèle* choisi. Le *modèle* finalement retenu est celui où le signal issu du dernier *compartiment* de transit active la prolifération tumorale (figure 3.5.a).

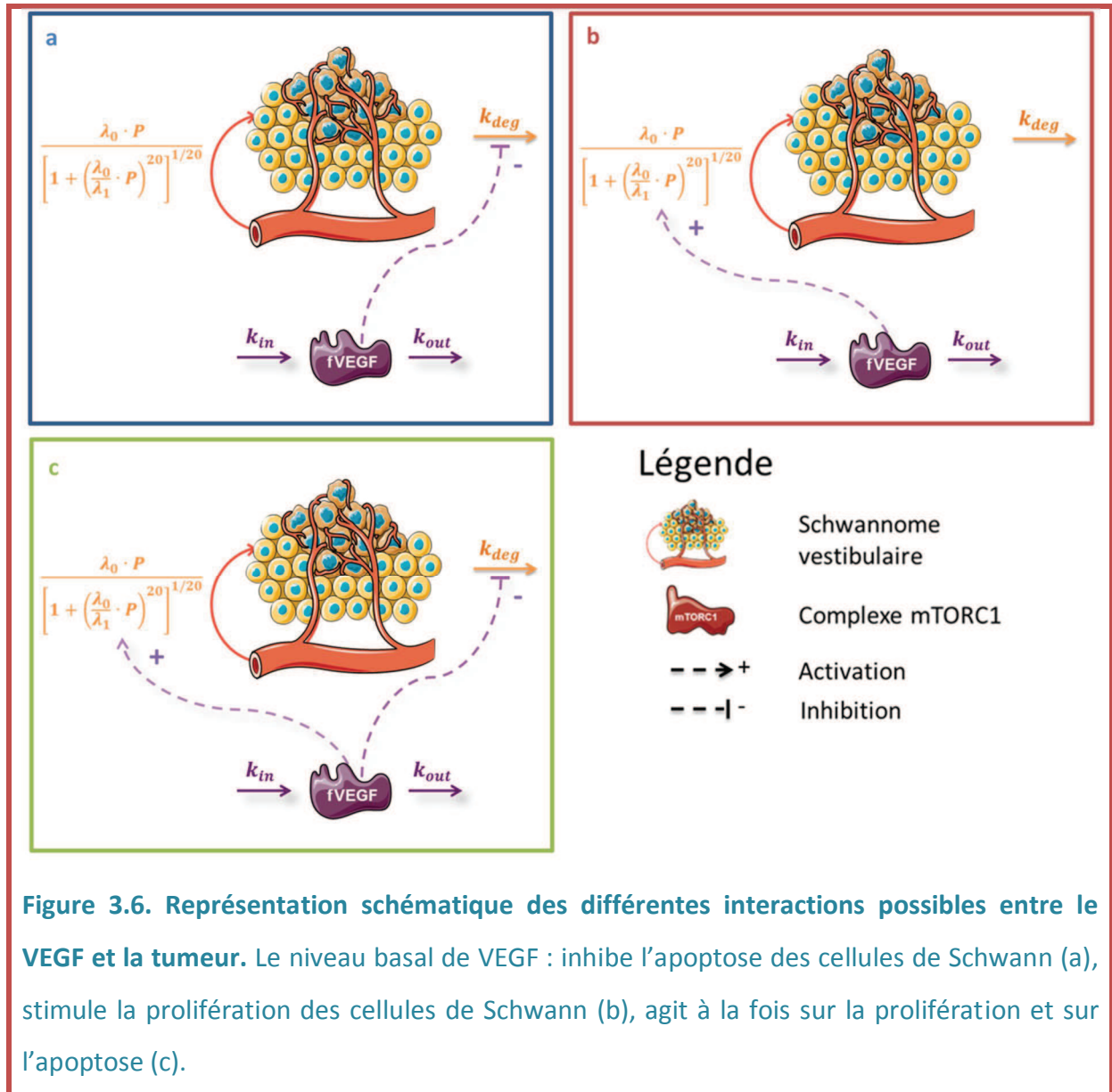


### 5. Interaction entre le VEGF et le SV

Pour modéliser les effets du bevacizumab et de l'everolimus, nous supposons que le VEGF est leur cible finale. De plus, nous avons vu précédemment que le VEGF joue un rôle



important dans la prolifération des cellules de Schwann ainsi que dans leur survie. C'est pourquoi nous avons décidé de tester trois interactions entre le VEGF et la tumeur (Fig. 3.6).



Sur la base des critères d'évaluation, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'on suppose que le VEGF inhibe l'apoptose des cellules de Schwann. Aucune amélioration n'est observée lorsque l'on suppose une action du VEGF à la fois sur la prolifération et sur l'apoptose (Fig. 3.6.c). Pour simplifier au maximum nous avons donc décidé de ne garder que l'effet du VEGF sur l'apoptose (Fig. 3.6.a)

## 6. Le modèle final

En rassemblant les différentes parties à la manière d'un puzzle, nous obtenons le modèle final illustré figure 1 de la publication présentée dans la partie I de ce chapitre. En absence de traitement, le niveau basal de VEGF permet au SV de croître selon une fonction de Simeoni. L'administration de bevacizumab permet de réduire directement le niveau de VEGF libre présent dans la circulation (fVEGF) tandis que celle d'everolimus permet de réduire le niveau basal de mTORC1 qui à son tour diminue le niveau basal de VEGF. La conséquence de cette diminution est la sensibilisation des cellules de Schwann à l'apoptose induite par l'hypoxie et donc une réduction de la taille tumorale. La figure 3 de la publication illustre bien le fonctionnement des différents éléments du modèle. De même, les équations décrivant ce modèle sont détaillées dans cette même publication.

## D. Résultats

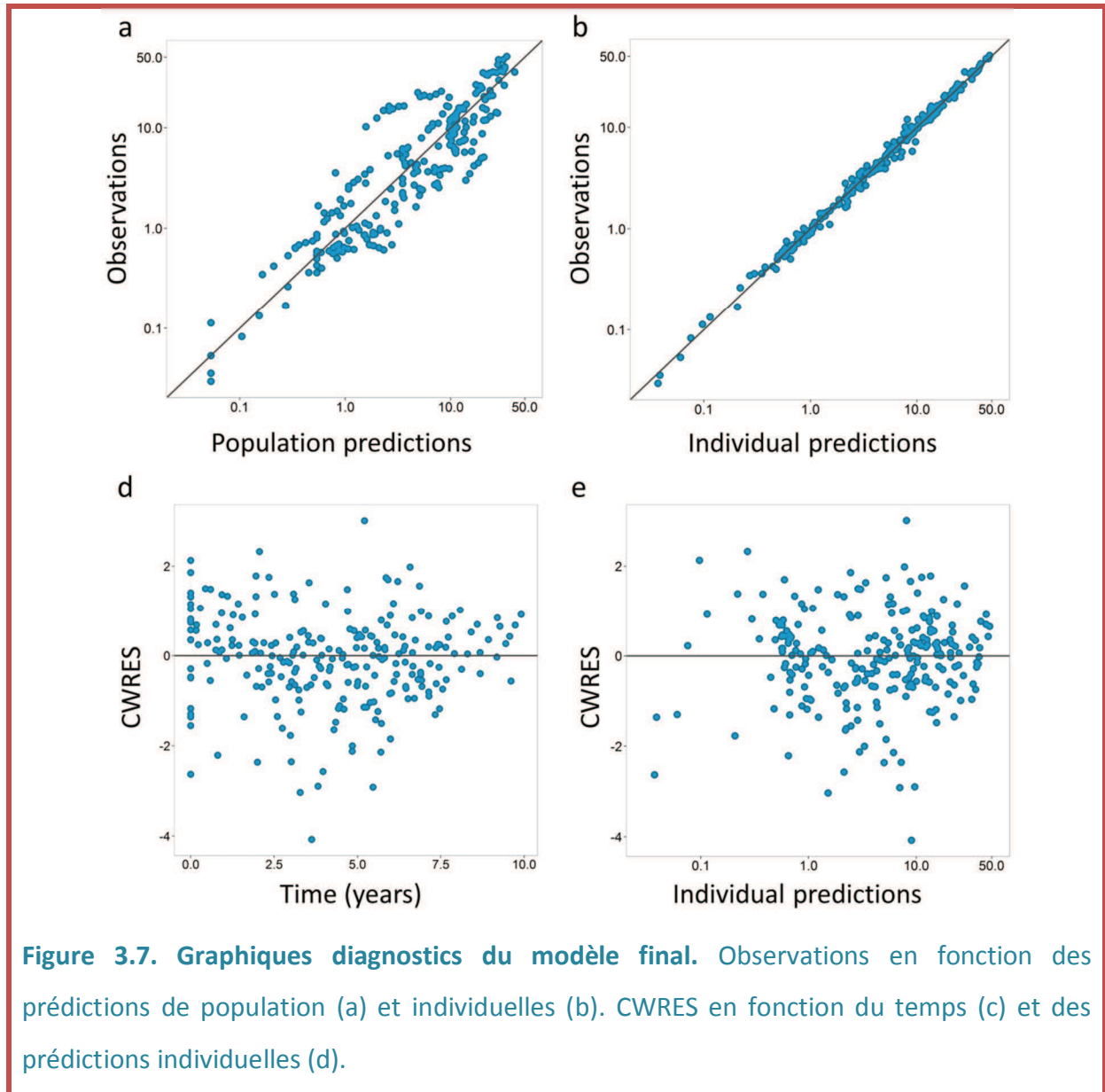
### 1. L'histoire naturelle de la croissance des SV

Nos résultats de modélisation montrent que la dynamique tumorale des SV se caractérise par une croissance en deux phases : une phase de croissance exponentielle définie par un temps de doublement d'environ 15 mois et une phase de croissance linéaire de vitesse  $0,3 \text{ cm}^3$  par mois (tableau 2 de la publication ci-dessus). Le changement de vitesse s'effectue lorsque la tumeur atteint environ  $7 \text{ cm}^3$ . Par conséquent les SV de petites tailles (stades 1 à 3) croissent exponentiellement tandis que les tumeurs plus grandes (stades 3 et 4) grandissent plus lentement. Ce ralentissement de la croissance pour les tumeurs de tailles importantes peut être attribué à des problèmes d'espace. Une étude a pu mettre en

évidence, chez des patients présentant des SV bilatéraux, que le retrait d'un des SV induit une accélération de la croissance tumorale du SV controlatéral [23]. Par conséquent, nos résultats paraissent cohérents avec la littérature.

## ***2. La pertinence de l'intégration de la littérature dans la construction du modèle semi-mécanistique***

Les données longitudinales de tailles tumorales ont pu être décrites de façon adéquate par notre modèle semi-mécanistique dont le développement s'est basé sur les informations de la littérature, notamment sur les mécanismes d'action du bevacizumab et de l'everolimus ainsi que sur les interactions entre le VEGF et les SV. Le tableau 2 de la publication ci-dessus montre que tous les paramètres sont estimés de façon précise. De plus, les graphiques diagnostics présentés sur la figure 2 de la publication ci-dessus et la figure 3.7 montrent que le modèle possède de bonnes performances descriptives aussi bien au niveau populationnel (figure 2.b et figure 3.7.a) qu'au niveau individuel (figure 2.a et figure 3.7.e). Nous pouvons en déduire que les informations issues de la littérature qui ont servi à créer les différentes parties du modèle nous ont permis de décrire correctement l'ensemble de nos données et en particulier le rebond que l'on observe suite à l'arrêt de l'everolimus. Bien que nous n'ayons pas de réponses précises sur les mécanismes responsables de ce phénomène, le modèle nous conforte dans l'idée qu'il existe une stimulation retardée de la prolifération tumorale sous everolimus comme l'illustre bien la figure 2.a de la publication ci-dessus.



### 3. La prédiction individuelle des dynamiques tumorales

#### a. Méthodologie

La méthodologie utilisée pour obtenir les prédictions individuelles est décrite en annexe à la fin de ce manuscrit.

Pour réaliser les prédictions individuelles, nous avons d'abord commencé par modifier la base de données originale en retirant des observations pour cinq patients d'intérêt

seulement. Cette base de données réduite a été analysée avec le modèle final dont les paramètres ont été réestimés par analyse bayésienne grâce à un algorithme de Monte-Carlo avec chaîne de Markov (MCMC) qui permet d'obtenir la distribution des paramètres individuels (méthode "BAYES" implémentée dans NONMEM). Cette distribution des paramètres individuels est un moyen d'obtenir l'incertitude qui existe pour chaque paramètre individuel. Les résultats présentés dans le tableau 2 de la publication ci-dessus ont servi d'information *a priori* pour l'analyse bayésienne MCMC.

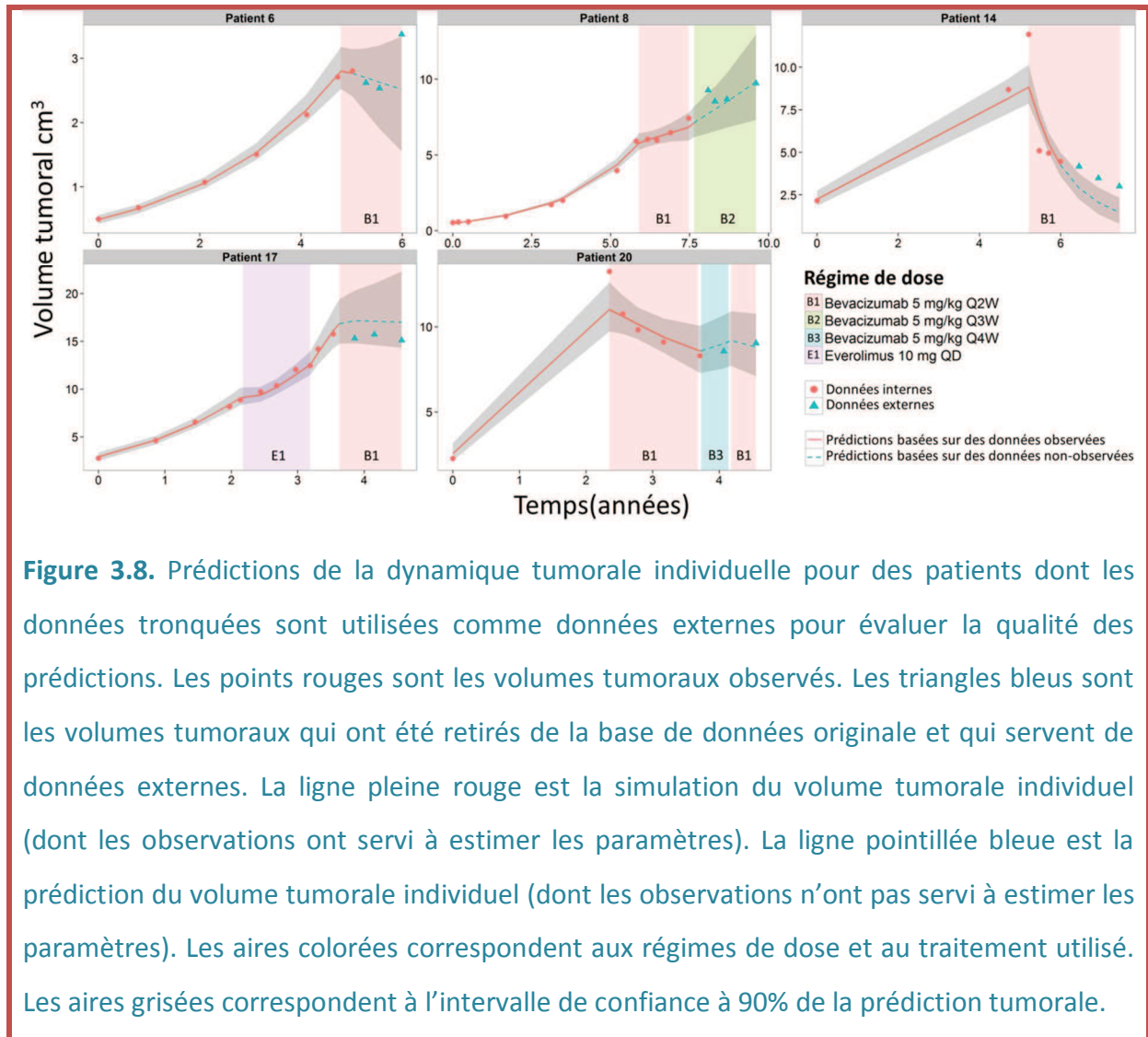
### ***b. Choix des patients d'intérêts***

L'objectif de prédictions individuelles est de savoir si notre modèle est capable de prédire l'évolution des SV lorsqu'un changement de la stratégie thérapeutique est réalisé, à savoir une réduction de dose du fait d'une intolérance au traitement ou un changement de molécule suite à un premier échec.

C'est pour cela que nous avons retiré spécifiquement certaines observations des cinq patients suivants (figure 3.8) :

- Changement du régime de dose : C'est le cas des patients 8 et 20. Les observations à partir du nouveau régime de dose ont été retirées.
- Changement du traitement suite à un premier échec : C'est le cas du patient 17 qui passe sous bevacizumab après un échec sous everolimus. Toutes les observations sous bevacizumab ont été retirées.
- Croissance atypique : C'est le cas du patient 14 qui est le seul à avoir un SV kystique. Nous voulions savoir si le modèle est capable de prédire la dynamique tumorale à venir pour un SV dont la croissance est différente de celle du reste de la population.

- Croissance normale : Le patient 6 n'a subi aucun changement (ni de dose, ni de traitement). Pour ce patient, nous avons gardé toutes les observations avant traitement et une seule sous traitement. L'objectif est de savoir si le modèle est capable de prédire la dynamique tumorale sous traitement lorsque nous ne disposons que d'une seule observation sous traitement.



**Figure 3.8.** Prédiction de la dynamique tumorale individuelle pour des patients dont les données tronquées sont utilisées comme données externes pour évaluer la qualité des prédictions. Les points rouges sont les volumes tumoraux observés. Les triangles bleus sont les volumes tumoraux qui ont été retirés de la base de données originale et qui servent de données externes. La ligne pleine rouge est la simulation du volume tumorale individuel (dont les observations ont servi à estimer les paramètres). La ligne pointillée bleue est la prédiction du volume tumorale individuel (dont les observations n'ont pas servi à estimer les paramètres). Les aires colorées correspondent aux régimes de dose et au traitement utilisé. Les aires grisées correspondent à l'intervalle de confiance à 90% de la prédiction tumorale.

### c. Résultats

Pour les patients 8 et 20, nous pouvons constater que le modèle prédit assez bien les conséquences d'un espacement des prises de bevacizumab (figure 3.8). Imaginons qu'un

patient tolère très mal le bevacizumab et que les médecins décident de diminuer la dose en espaçant les prises. Si le modèle prédit, comme c'est le cas ici, une progression de la maladie sous le nouveau régime de dose, les cliniciens vont pouvoir d'emblée orienter leur prise en charge vers l'option chirurgicale afin de maximiser les chances de préserver les fonctions nerveuses du patient ; au lieu de réduire la dose et finalement se rendre compte trop tard de l'inefficacité du traitement pour ce patient.

Pour le patient 17, le modèle réussit à prédire une stabilisation de la croissance tumorale sous bevacizumab après un premier échec sous everolimus. Ici aussi ce constat est très intéressant pour aider les cliniciens à savoir s'il y a possibilité de maîtriser l'évolution de la maladie ou si la chirurgie doit être réalisée rapidement.

Pour ces trois patients nous disposons d'environ quatre observations sous traitement, ce qui semble fournir assez d'informations pour estimer les paramètres d'effets comme  $K_{deg}$  ou  $IC_{50}$  et obtenir des prédictions individuelles correctes. Nous avons donc cherché à savoir si une prédiction précise de l'évolution du SV peut être obtenue avec moins d'observations sous traitement.

Pour le patient 6, même si la médiane des prédictions suit bien l'allure des données observées, la précision est moins bonne puisque l'intervalle de prédiction est plus large. Nous nous attendions à ce résultat puisqu'avec seulement une observation sous traitement, peu d'information est disponible pour que l'incertitude sur le paramètre  $K_{deg}$  soit faible.

Enfin pour le patient 14, le modèle n'est pas capable de décrire et prédire correctement la dynamique du SV. Comme ce patient possède un SV kystique dont l'évolution est différente des SV classiques, il peut être vu comme un témoin négatif de la croissance des SV du reste de l'échantillon de patients dont nous disposons.

## E. Discussion

Le développement d'un modèle semi-mécanistique à effets-mixtes nous a permis de bien décrire les dynamiques tumorales des SV de patients atteints de NF2. Nous avons pu caractériser la croissance des SV sans traitement et ainsi mieux observer les effets propres au bevacizumab et à l'everolimus.

De plus, le modèle final nous a permis de prédire l'évolution des SV faisant suite à un changement de la stratégie médicale que ce soit une réduction de dose ou un changement de molécule. Cela ouvre la voie à l'adaptation thérapeutique individualisée et permettrait aux cliniciens d'orienter la prise en charge thérapeutique plus rapidement et efficacement.

Nous sommes conscients que ces résultats préliminaires, bien que prometteurs, doivent être l'objet d'une analyse à plus grande échelle, afin d'améliorer la fiabilité et la robustesse des prédictions.

## F. Références

1. Blakeley JO, Evans DG, Adler J, et al. (2012) Consensus recommendations for current treatments and accelerating clinical trials for patients with neurofibromatosis type 2. *Am J Med Genet Part A* 158 A:24–41. doi: 10.1002/ajmg.a.34359
2. Webster G, Carlos R, Filho O, Oliveira A De (2013) Atypical Manifestation of Vestibular Schwannoma. *Int Arch Otorhinolaryngol* 17:419–420. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351673>
3. Springborg JB, Poulsgaard L, Thomsen J (2008) Nonvestibular schwannoma tumors in the cerebellopontine angle: a structured approach and management guidelines. *Skull Base* 18:217–27. doi: 10.1055/s-2007-1016959
4. Blausen.com staff (2014) Blausen gallery 2014. *Wikiversity J Med*. doi: 10.15347/wjm/2014.010



5. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG, et al. (2009) Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med* 361:358–367. doi: 10.1056/NEJMoa0902579
6. Mautner V, Nguyen R, Kutta H, et al. (2010) Bevacizumab induces regression of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol* 12:14–8. doi: 10.1093/neuonc/nop010
7. Alanin MC, Klausen C, Caye-Thomasen P, et al. (2014) The effect of bevacizumab on vestibular schwannoma tumour size and hearing in patients with neurofibromatosis type 2. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. doi: 10.1007/s00405-014-3398-3
8. Farschtschi S, Kollmann P, Dalchow C, et al. (2015) Reduced dosage of bevacizumab in treatment of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. doi: 10.1007/s00405-015-3604-y
9. Goutagny S, Raymond E, Esposito-Farese M, et al. (2015) Phase II study of mTORC1 inhibition by everolimus in neurofibromatosis type 2 patients with growing vestibular schwannomas. *J Neurooncol* 122:313–320. doi: 10.1007/s11060-014-1710-0
10. Karajannis M a., Legault G, Hagiwara M, et al. (2014) Phase II study of everolimus in children and adults with neurofibromatosis type 2 and progressive vestibular schwannomas. *Neuro Oncol* 16:292–297. doi: 10.1093/neuonc/not150
11. EMA (2009) Résumé des Caractéristiques du Produit: BEVACIZUMAB. 1–78.
12. Coppin C (2010) Everolimus: the first approved product for patients with advanced renal cell cancer after sunitinib and/or sorafenib. *Biologics* 4:91–101. doi: 10.2147/BTT.S6748
13. Chiang GG, Abraham RT (2007) Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13:433–442. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.001
14. Lane H a., Wood JM, McSheehy PMJ, et al. (2009) mTOR Inhibitor RAD001 (Everolimus) Has Antiangiogenic/Vascular Properties Distinct from a VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Cancer Res* 15:1612–1622. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2057
15. Pópulo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13:1886–1918. doi: 10.3390/ijms13021886
16. EMA Résumé des Caractéristiques du Produit: EVEROLIMUS. 1–96.
17. Simeoni M, Magni P, Cammia C, et al. (2004) Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res* 64:1094–101.
18. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P (2004) VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays* 26:943–954. doi: 10.1002/bies.20092
19. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P (2009) Role and

- therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* 89:607–648. doi: 10.1152/physrev.00031.2008
20. Caye-Thomasen P, Baandrup L, Jacobsen GK, et al. (2003) Immunohistochemical demonstration of vascular endothelial growth factor in vestibular schwannomas correlates to tumor growth rate. *Laryngoscope* 113:2129–2134. doi: 10.1097/00005537-200312000-00014
  21. Panoilia E, Schindler E, Samantas E, et al. (2015) A pharmacokinetic binding model for bevacizumab and VEGF165 in colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 75:791–803. doi: 10.1007/s00280-015-2701-3
  22. FDA (2008) Everolimus Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s).
  23. Peyre M, Goutagny S, Imbeaud S, et al. (2011) Increased growth rate of vestibular schwannoma after resection of contralateral tumor in neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol* 13:1125–32. doi: 10.1093/neuonc/nor101

## **CHAPITRE 4**

---

### **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

Les inhibiteurs de l'angiogenèse font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique pour le traitement des cancers. Bon nombre d'entre eux sont utilisés en association avec des molécules cytotoxiques, c'est-à-dire des molécules qui ciblent directement les cellules tumorales pour les tuer. Nous avons vu dans ces travaux des thèses que certaines molécules anti-angiogéniques utilisées seules, comme le pazopanib ou le bevacizumab, avaient la capacité d'induire une réduction tumorale semblable à celle que l'on observe chez des tumeurs traitées avec des agents cytotoxiques. Nous avons pu décrire les effets de ces inhibiteurs de l'angiogenèse et mieux les comprendre grâce à l'utilisation de modèles intégrant des informations issues de la littérature. D'une part, il y a les informations qui font partie du modèle comme les modèles PK et leurs paramètres. Dans le cas du bevacizumab et de l'everolimus, nous avons respectivement utilisé un modèle QSS-TMDD et un modèle PK classique à deux compartiments avec une absorption et une élimination linéaires. D'autre part, les informations sur les tumeurs et sur les mécanismes des molécules nous aident à créer le modèle et à tester différentes hypothèses. Dans le cas du pazopanib, nous avons pu tester différents effets du médicament sur le carcinome à cellules rénales et ce grâce au fait que le VEGF est surexprimé par la tumeur et agit aussi bien sur la tumeur que sur sa vascularisation (cellules endothéliales). Dans le cas des schwannomes vestibulaires, la littérature confirme que le VEGF possède des effets importants sur les cellules de Schwann (sur la prolifération et sur la protection des cellules contre l'apoptose induite par l'hypoxie). Nous avons aussi pu mettre en évidence que l'inhibition du complexe mTORC1 par l'everolimus aboutissait à une prolifération tumorale retardée permettant d'expliquer le rebond observé à l'arrêt du traitement.

Nous sommes conscients que ces modèles sont plus complexes que des modèles plus empiriques, mais leur avantage, c'est qu'ils nous ont permis de tester différentes hypothèses quant aux potentiels mécanismes d'action des inhibiteurs de l'angiogenèse ; ou d'intégrer au sein d'un même modèle, deux molécules agissant sur des sites d'action différents.

Dans le cas du pazopanib le modèle avec un double effet de la molécule sur la dynamique tumorale préclinique est celui qui a permis de mieux décrire les données avec de bons graphiques diagnostiques comparé à tous les autres modèles testés. Cela est dû au fait du profil non monotone de la dynamique tumorale sous pazopanib difficilement descriptible par les modèles empiriques. Nous avons pu mettre en évidence ces résultats sur des dynamiques tumorales chez des patients de phase II grâce à l'analyse que nous avons réalisée à partir des données précliniques. Grâce à ce modèle semi-mécanistique, nous avons pu soumettre l'hypothèse que certains patients ayant progressé selon les critères RECIST auraient pu avoir une réduction tumorale tardive due à l'effet anti-angiogénique du pazopanib. Par conséquent, la façon dont l'étude a été réalisée peut aboutir à une sous-estimation de l'efficacité du pazopanib.

Dans le cas des schwannomes vestibulaires, la complexité du modèle est justifiée par l'action du bevacizumab et de l'everolimus sur deux sites d'action différents. Le bevacizumab agit en fixant une molécule de VEGF afin de contrer ses effets sur les cellules de Schwann, à savoir une protection contre l'apoptose induite par l'hypoxie. De son côté l'everolimus agit indirectement sur le VEGF en inhibant sa synthèse, puis à plus long terme, stimule la prolifération tumorale via une cascade de signalisation secondaire. L'inconvénient principal vient du fait que nous simulons des concentrations de médicaments et de VEGF qui sont uniques pour tous les patients.

Que ce soit l'étude avec le pazopanib ou celle avec le bevacizumab et l'everolimus, des études complémentaires doivent être réalisées sur des populations à plus grande échelle pour augmenter la robustesse des résultats.

Dans le cas du projet sur les effets du pazopanib, une première perspective d'étude concerne la transition entre l'analyse préclinique et clinique. Pour cela, nous avons comparé le rapport des paramètres d'efficacités ( $\lambda, \gamma, \alpha, \delta$ ) préclinique et clinique du modèle (Tableau S2 de la partie I du Chapitre 2) au ratio allométrique de 7,3  $\left(7,3 = \left(\frac{70}{0,025}\right)^{0,25}\right)$  permettant de convertir le temps chronologique en temps physiologique. Bien que les rapports des paramètres estimés ne soient pas exactement égaux à 7,3, ils restent du même ordre de grandeur. Un effort reste à faire pour trouver un moyen de convertir les paramètres précliniques en paramètres cliniques afin de prédire la dynamique tumorale chez l'homme à partir des données chez l'animal. La seconde perspective d'étude porte sur l'évaluation de l'efficacité clinique du pazopanib. Pour cela, il faut réaliser une nouvelle analyse en intégrant le reste des patients de l'étude de phase II (N = 225). Dans un second temps il serait intéressant de réaliser une nouvelle étude en modifiant les critères d'évaluation de progression de la maladie en augmentant par exemple le seuil pour lequel la tumeur progresse ou en observant la dynamique tumorale sur un temps minimal permettant d'observer la deuxième décroissance tumorale due à l'effet anti-angiogénique du pazopanib.

Dans le cas du projet sur les effets du bevacizumab et de l'everolimus, il faudrait augmenter le nombre de patients pour confirmer les résultats de notre étude préliminaire et augmenter leur robustesse. Une étude avec des concentrations de bevacizumab, d'everolimus et de VEGF permettrait d'accroître la fiabilité du modèle et de réduire la

variabilité sur les paramètres d'effets ( $k_{deg}$ ,  $IC_{50}$ ). Il serait d'un grand intérêt d'étudier le nombre optimal d'observations avant et sous traitement pour obtenir des prédictions individuelles fiables permettant au clinicien d'adapter la stratégie thérapeutique le plus rapidement possible. Cette étude, nécessaire, permettrait à un nouveau patient de connaître l'évolution de son schwannome vestibulaire en fonction d'un nombre minimum d'observations avant et sous traitement. L'objectif principal de notre étude est de convaincre d'autres équipes de la communauté NF2 de faire analyser leurs données.

De nouvelles molécules de plus en plus complexes, ciblant spécifiquement une ou plusieurs cibles de l'angiogenèse voient le jour. La pharmacométrie est devenue une discipline d'intérêt pour analyser ces données, comprendre les mécanismes sous-jacents et proposer des solutions permettant de faciliter le développement.

Nous avons appliqué cette méthodologie, utilisant des outils mathématiques et statistiques dont la rationalité est basée sur la biologie des tumeurs et la pharmacologie des molécules, sur deux projets d'envergure : les effets précliniques et cliniques du pazopanib pour le traitement du carcinome à cellules rénales d'une part et les effets du bevacizumab et de l'everolimus sur les schwannomes vestibulaires de patients NF2 d'autre part. Pour chacun de ces deux projets, nous avons pu décrire de façon adéquate les dynamiques tumorales en développant des modèles dont la complexité est justifiée par les renseignements issus de la littérature et par les informations que nous avons pu en tirer.

---

# ANNEXE

---



Dans cette partie, nous allons brièvement décrire le principe du fonctionnement des systèmes d'équations différentielles (EDO) et ce qu'est l'approche de population. Nous verrons quelques méthodes d'estimations paramétriques ainsi que les méthodes d'évaluation des modèles que nous avons utilisées lors de ces travaux de thèse.

Il est important de préciser que cette partie a pour objectif de rendre accessible à des personnes non issues des mathématiques, dont je fais partie, ce qu'est l'analyse de population et les outils nécessaires à la bonne compréhension de cette méthode d'analyse. Je réalise ici un travail que j'estime nécessaire, de compréhension des outils mathématiques et statistiques, en utilisant parfois des notations personnelles ou un vocabulaire grand public.

## I- Principe des équations différentielles ordinaires

En principe, la modélisation PK repose sur l'utilisation de compartiments. Un compartiment est un espace virtuel dans lequel le médicament va se distribuer de façon instantanée et homogène. Les compartiments sont représentés par des systèmes d'EDO qui décrivent la variation d'une variable en fonction du temps.

Prenons un exemple simple pour comprendre comment fonctionne un système d'EDO ; celui du remplissage d'une baignoire  $B$  à partir d'une cuve  $C$  contenant un volume d'eau  $V_C$  égale à 100 litres (figure A.1). On s'intéresse à l'évolution du volume d'eau dans la baignoire  $V_B$  en fonction du temps. Dans les conditions initiales, c'est-à-dire avant de prendre un bain, le volume dans la cuve  $V_C$  est à 100 L tandis que la baignoire est vide ( $V_B = 0$  L). Lorsque l'on ouvre le robinet, l'eau passe de la cuve à la baignoire à une certaine vitesse. Ainsi, le débit sortant de la cuve est égale à celui qui arrive dans la baignoire. Dans le système d'EDO, ce débit correspond au produit entre le volume disponible dans la cuve  $V_C$  et une constante de transfert, que l'on appelle ici  $k_R$  (constante de remplissage), qui module la vitesse à laquelle l'eau quitte la cuve pour remplir la baignoire. Cette constante est exprimée en  $\text{minute}^{-1}$  dans notre exemple. Toute variation de la quantité d'eau dans un compartiment d'intérêt correspond à la somme de ce qui arrive d'un autre compartiment et/ou à la soustraction de ce qui quitte le compartiment d'intérêt (Figure A.1).

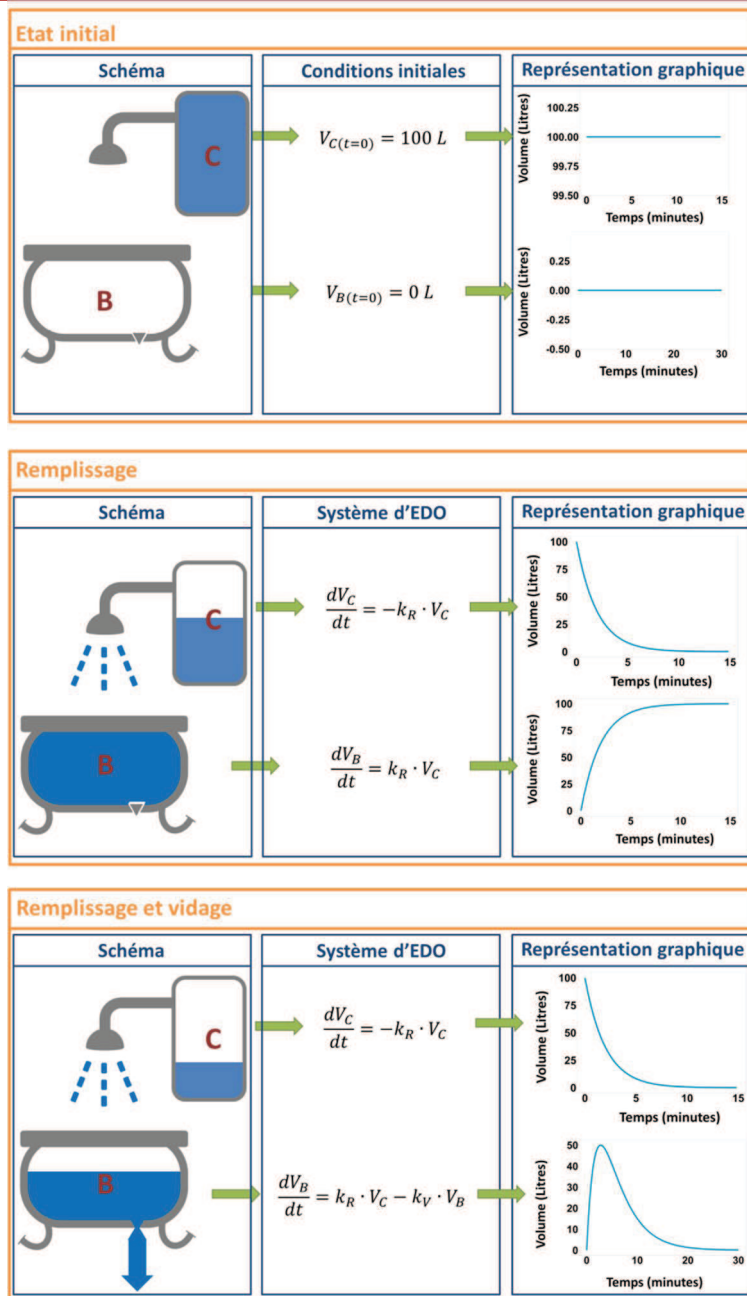


Figure A.25. Illustration du principe de fonctionnement d'un système d'EDO grâce à l'exemple du remplissage d'une baignoire. C correspond au compartiment 'Cuve' et B à celui de la 'Baignoire'.  $V_C$  est le volume de la cuve et  $V_B$  celui de la baignoire, tous les deux exprimés en L.  $k_R$  et  $k_V$  sont les constantes de remplissage et de vidange de la baignoire en  $\text{minute}^{-1}$ .

Le système d'EDO montre que durant la phase de remplissage de la baignoire, le volume d'eau dans celle-ci augmente à une certaine vitesse jusqu'à un volume maximal de 100 L pendant que le volume d'eau dans la cuve, initialement à 100 L, diminue jusqu'à 0 L et ce à la même vitesse.

Imaginons maintenant que pendant la phase de remplissage, le cache trou de la baignoire soit retiré et que celle-ci se vide selon une constante de vidange  $k_V$ . Au débit d'eau provenant de la cuve ( $k_R \cdot V_C$ ) il faut maintenant soustraire celui qui quitte la baignoire ( $k_V \cdot V_B$ ). Ainsi, la baignoire, totalement vide au départ, se remplit avant de se vider de nouveau. En réalité le remplissage de la baignoire dépend de la différence entre  $k_R$  et  $k_V$ . Si  $k_V$  est très supérieur à  $k_R$ , la baignoire ne se remplira jamais et vice versa.

## II- L'APPROCHE DE POPULATION

### A. Généralités

#### 1. Principe des modèles non-linéaires à effets mixtes

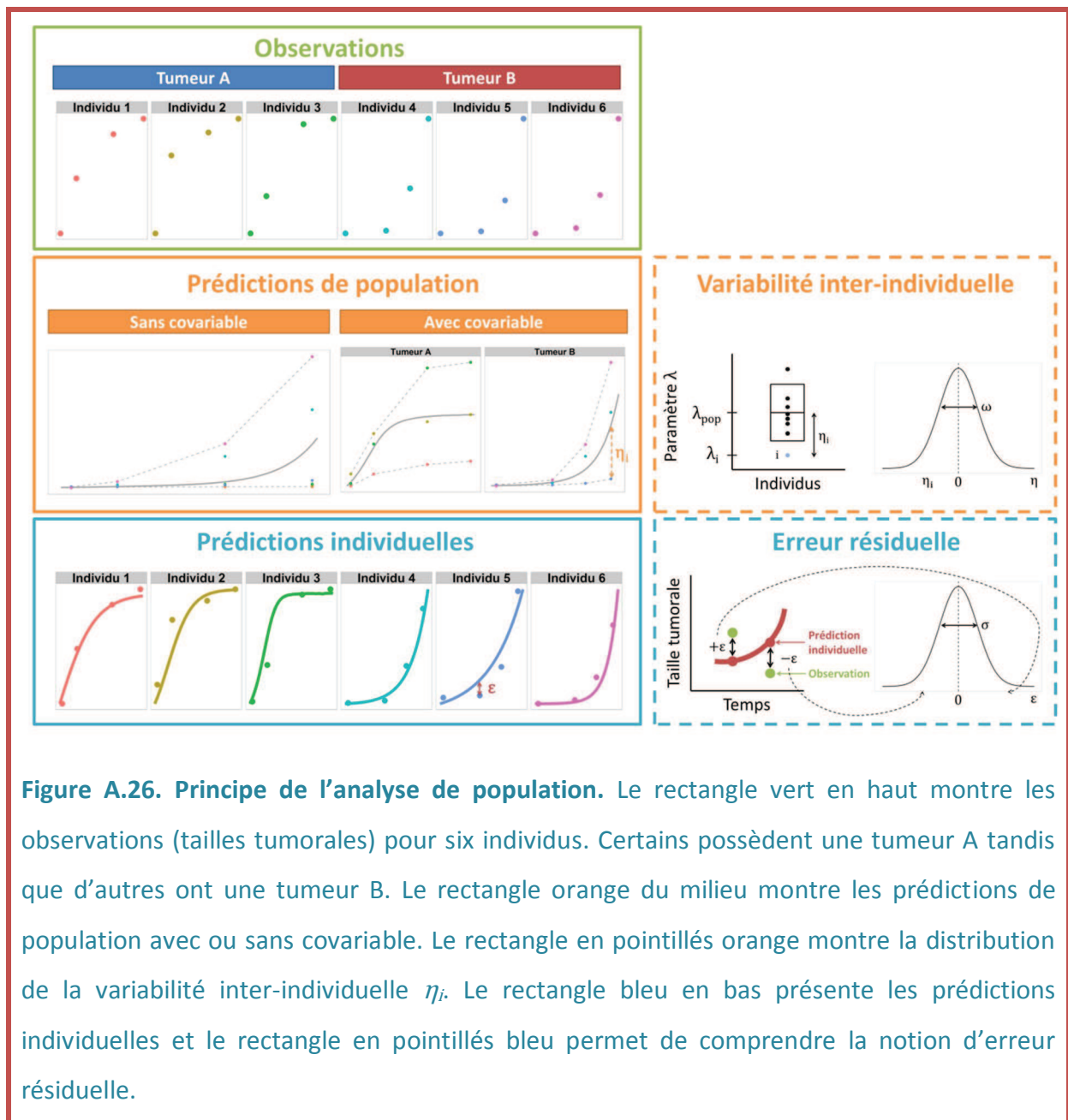


Figure A.26. Principe de l'analyse de population. Le rectangle vert en haut montre les observations (tailles tumorales) pour six individus. Certains possèdent une tumeur A tandis que d'autres ont une tumeur B. Le rectangle orange du milieu montre les prédictions de population avec ou sans covariable. Le rectangle en pointillés orange montre la distribution de la variabilité inter-individuelle  $\eta_i$ . Le rectangle bleu en bas présente les prédictions individuelles et le rectangle en pointillés bleu permet de comprendre la notion d'erreur résiduelle.

L'approche de population a été introduite par Lewis Sheiner en 1972 et porte sur l'utilisation de modèles non-linéaires à effets mixtes dont le principe général est illustré figure A.2 [1]. Prenons l'exemple d'une population de six individus  $i$  ( $i = 1, \dots, 6$ ) possédant chacun quatre observations  $j$  ( $j = 1, \dots, 4$ ) (tailles tumorales). Certains possèdent un type tumoral A tandis que d'autres individus ont une tumeur B. L'objectif est de regrouper l'ensemble des observations pour les analyser simultanément grâce à un modèle non-linéaire tel que décrit dans le chapitre 1 section II.C. Les paramètres de ce modèle sont considérés comme des variables aléatoires dont on va chercher à estimer la moyenne et la variance. Les paramètres moyens vont permettre de décrire la dynamique de la population des six individus. Pour décrire les dynamiques propres à chaque individu, des paramètres individuels sont tirés à partir de leur distribution respective. Pour un paramètre donné, comme la constante de croissance de la tumeur  $\lambda$  dans notre exemple, l'écart  $\eta_i$  entre la valeur moyenne de la population  $\lambda_{pop}$  et celle d'un individu  $\lambda_i$  représente la variabilité interindividuelle (IIV). Cet effet aléatoire se distribue souvent selon une loi normale :  $\eta_i \sim N(0, \omega^2)$  où  $\omega$  est l'écart-type quantifiant l'IIV du paramètre. Cette IIV se matérialise sur les courbes de population par l'écart entre la courbe de prédiction de population et la courbe de prédiction individuelle. L'IIV peut s'expliquer grâce à l'utilisation de covariables. Dans la figure A.2, il s'agit du type de la tumeur (A ou B). Au niveau des prédictions individuelles, l'écart  $\varepsilon_{ij}$  qui subsiste entre la valeur observée et la valeur prédite est appelée erreur résiduelle dont la distribution suit une loi normale :  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ . De même,  $\sigma$  est l'écart-type quantifiant la distribution de l'erreur résiduelle. Cette erreur correspond à de la variabilité que l'on ne peut pas expliquer comme des erreurs liées à la mesure des tumeurs ou de la variabilité intra-individuelle par exemple.

Ainsi, les paramètres moyens constituent les effets fixes, tandis que l'IIV et l'erreur résiduelle représentent les effets aléatoires du modèle. Cette combinaison d'effets fixes et d'effets aléatoires est à l'origine de l'appellation 'effets mixtes' de cette méthodologie.

## 2. Expressions mathématiques

Pour un individu  $i$  ( $i = 1, \dots, N$ ) provenant d'un échantillon de  $N$  individus, la  $j^{\text{ième}}$  ( $j = 1, \dots, n_i$ ) observation  $y_{ij}$  est décrite par le modèle suivant :

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_{ij}, t_{ij}, z_i) + g(\theta_i, D_{ij}, t_{ij}, z_i)\varepsilon_{ij} \quad (1)$$

### a. Le modèle structurel $f$

$f$  correspond au modèle structurel qui est un modèle souvent non-linéaire décrivant l'évolution temporelle de la variable observée (chapitre 1 section II). Ce modèle structurel est fonction :

- des paramètres individuels  $\theta_i$  du sujet  $i$ .  $p = 1, \dots, P$ , correspond au nombre de paramètres que comporte le modèle. On notera  $\theta_{i(p)}$  le  $p^{\text{ième}}$  paramètre du sujet  $i$ .  $\theta_i$  est donc un vecteur de dimension  $p$ . Dans le cas d'une croissance de Simeoni, ce vecteur comporte trois paramètres :  $TS_0$ ,  $\lambda_0$  et  $\lambda_1$  (voir chapitre 1 section II.C.1.a).
- de la dose  $D_{ij}$  de l'individu  $i$  administrée à la  $j^{\text{ième}}$  observation.
- du temps  $t_{ij}$  auquel est mesurée la  $j^{\text{ième}}$  observation de l'individu  $i$ .
- du vecteur  $z_i$  des covariables de l'individu  $i$ . Ces covariables peuvent être l'âge, le sexe, le stade tumoral ou une mutation génétique. Dans certains cas les covariables

peuvent dépendre du temps mais nous ne développerons pas ce point dans ce manuscrit.

Les paramètres individuels  $\theta_i$  sont des effets mixtes qui se décomposent en effet fixes  $\mu$  et en effets aléatoires individuels  $\eta_i$ . En général on utilise une distribution log-normal pour  $\theta_i$  qui est utile pour assurer la positivité des paramètres estimés (équation 2). Un volume de distribution ou une croissance tumorale ne peuvent pas être négatifs par exemple.

$$\theta_{i(p)} = \mu_{(p)} \cdot e^{\eta_{i(p)}} \quad \text{soit} \quad \ln(\theta_{i(p)}) \sim N(\ln(\mu_{(p)}), \omega_{(p)}^2) \quad (2)$$

$\mu_{(p)}$  correspond à la valeur moyenne du  $p^{\text{ième}}$  paramètre, c'est ce que l'on appelle la valeur typique de la population. Dans le cas d'un seul paramètre ( $p = 1$ )  $\theta_{i(p)}$  suit une loi log-normale de moyenne  $\mu_{(p)}$  et de variance  $\omega_{(p)}^2$ . Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie II.A.1, l'IIV  $\eta_i$  suit généralement une loi normale de moyenne nulle et de variance  $\omega^2$ . Dans le cas de plusieurs paramètres ( $p > 1$ ), la distribution des effets aléatoires suit une loi multivariée  $\eta_{i(p)} \sim N(0, \Omega)$  où  $\Omega$  correspond à la matrice de variance-covariance (de dimension  $p \times p$ ) des IIV de chaque paramètre.

### 3. Les modèles d'erreurs $g$

$g$  correspond au modèle de l'erreur résiduelle qui permet de quantifier l'écart qui subsiste entre la prédiction individuelle et la valeur observée ( $\varepsilon_{ij}$ ). Ce modèle d'erreur est généralement de la forme suivante :



$$g(\theta_i, D_{ij}, t_{ij}, z_i) = \sigma_{inter} + \sigma_{slope} \cdot f(\theta_i, D_{ij}, t_{ij}, z_i) \quad (3)$$

Si  $\sigma_{slope} = 0$ , le modèle est dit additif. La variance de l'erreur résiduelle reste constante, peu importe les valeurs des prédictions. C'est ce que l'on appelle aussi une variance homoscedastique. Dans ce cas, l'écart-type  $\sigma_{inter}$  est de même unité que la variable observée.

Si  $\sigma_{inter} = 0$ , le modèle est dit proportionnel. La variance de l'erreur résiduelle est proportionnelle aux prédictions. Dans ce cas, l'écart-type  $\sigma_{slope}$  est exprimé en proportion de la variable observée.

Si aucun d'entre eux n'est égal à zéro, on parle de modèle d'erreur combiné.

Selon l'expression générale du modèle présenté dans l'équation 1, la distribution des effets aléatoires  $\varepsilon_{ij}$  suit une loi normale centrée réduite  $\varepsilon_{ij} \sim N(0,1)$ . Ainsi, en multipliant  $\varepsilon_{ij}$  par le modèle d'erreur  $g$ ,  $\sigma_{slope}^2$  et/ou  $\sigma_{inter}^2$  deviennent les variances de l'erreur résiduelle comme initialement présenté dans la section II.A.1. On notera par la suite  $\Sigma$ , la matrice diagonale des erreurs résiduelles comprenant l'ensemble des variances additives et/ou proportionnelles du modèle.

En conclusion, les paramètres nécessitant d'être estimés sont les paramètres typiques de la population  $\mu_{(p)}$  (effets fixes), la matrice de variance-covariance  $\Omega$  décrivant les IIV (effets aléatoires  $\eta_j$ ), la matrice de variance-covariance  $\Sigma$  décrivant l'erreur résiduelle (effets aléatoires  $\varepsilon_{ij}$ ) et enfin les paramètres d'effets des covariables (non décrits dans ce manuscrit). Nous noterons par la suite  $\Psi$ , l'ensemble de ces paramètres de population que nous cherchons à estimer.

## B. Méthodes d'estimation paramétrique

L'estimation des paramètres repose sur deux approches distinctes, celle du maximum de vraisemblance et celle de l'approche bayésienne. Nous expliquerons brièvement l'historique et les principes des diverses méthodes qui ont été développées ces dernières années, sans rentrer dans les détails mathématiques des algorithmes qui sont hors du champ de ce manuscrit.

### *1. Approche du maximum de vraisemblance : la vraisemblance approchée*

#### *a. Calcul de la vraisemblance*

Dans l'approche du maximum de vraisemblance, on cherche à estimer les paramètres qui vont maximiser la vraisemblance que l'on note  $l(\Psi ; y)$ . Cette vraisemblance correspond en fait à la probabilité que l'on puisse observer les observations  $y$  sachant les paramètres  $\Psi$ . Cette probabilité est égale au produit des vraisemblances individuelles, elles-mêmes obtenues par intégration sur l'ensemble de la distribution  $\mathcal{D}$  des effets aléatoires interindividuels (équation 4).

$$\begin{aligned}
 l(\Psi ; y) &= p(y | \Psi) \\
 &= \prod_{i=1}^N l(\Psi ; y_i) \\
 &= \prod_{i=1}^N \int_{\mathcal{D}} p(y_i | \eta_i, \Psi) p(\eta_i, \Psi) d\eta_i
 \end{aligned} \tag{4}$$

Etant donné que le modèle structurel  $f$  est non-linéaire, l'intégrale de l'équation 4 n'a pas de solution analytique. Pour pouvoir calculer l'intégrale et donc la vraisemblance  $l(\Psi ; y)$  il va falloir linéariser le modèle  $f$ .

Des méthodes de linéarisation ont été proposées notamment la méthode FO (First Order) et la méthode FOCE (First Order Conditional Estimate) ; toutes les deux basées sur le développement limité à l'ordre 1 de la fonction  $f$ .

La méthode FO, introduite en 1972 par Lewis Sheiner, propose de linéariser  $f$  grâce à un développement de Taylor de premier ordre au voisinage des effets fixes  $\mu$ , c'est-à-dire pour une moyenne des effets aléatoires  $\eta_i$  nulle [1, 2]. La collaboration entre Lewis Sheiner et Stuart Beal mène au développement du logiciel NONMEM (NONlinear Mixed-Effects Modeling) où est implémentée la méthode FO [3, 4]. Ce logiciel est encore aujourd'hui une référence pour la modélisation par approche de population.

En 1990, Lindstrom et Bates améliore la méthode FO en basant la linéarisation autour des estimations des effets aléatoires  $\eta_i$  [5]. L'appellation FOCE vient du fait que l'estimation est conditionnelle de  $\eta_i$ . Cette méthode est très largement utilisée dans la communauté pharmacométrique que ce soit au niveau académique ou dans l'industrie pharmaceutique.

La faiblesse de ses méthodes réside dans le fait qu'elles calculent une vraisemblance approchée, ce qui peut introduire un biais dans l'estimation des paramètres. Parmi ces biais on peut citer l'inconsistance de ces méthodes en fonction du nombre d'individus et d'observations par individu [6, 7], ou encore le manque de précision sur les estimations lorsque la variance de l'erreur interindividuelle est élevée [8] (c'est-à-dire pour une forte IIV). De plus, ces méthodes sont sensibles aux conditions initiales qui doivent rester assez proches des estimations finales.

### *b. Maximisation de la vraisemblance*

L'objectif des méthodes FO ou FOCE est de simplifier la fonction  $f$  afin de permettre une expression analytique de la vraisemblance. A partir de cette formule de la vraisemblance approchée, un algorithme itératif permettant d'estimer les paramètres maximisant la vraisemblance est utilisé. Ces paramètres  $\hat{\Psi}$  sont appelés estimateurs du maximum de vraisemblance ou MLE (Maximum Likelihood Estimate) et représentent les paramètres  $\Psi$  pour lesquels la probabilité d'observer les données expérimentales  $y$  est la plus grande.

$$\hat{\Psi} = \underset{\Psi}{\operatorname{argmax}} p(y | \Psi) \quad (5)$$

En pratique, maximiser la vraisemblance revient à maximiser la log-vraisemblance et donc à minimiser l'opposé de la log-vraisemblance. Le logiciel NONMEM calcule une vraisemblance sous la forme  $-2 \cdot \log(\text{vraisemblance})$  ( $-2LL$ ) qui est plus facile à optimiser.

L'algorithme de Newton-Raphson est un algorithme de minimisation qui trouve le minimum d'une fonction à partir de l'annulation de sa dérivée (ou de son gradient si la dimension est supérieure à 1). Dans notre cas, la fonction à minimiser est  $-2LL$ . C'est cet algorithme qui a servi à développer le logiciel NONMEM vers la fin des années 70.

A la toute première étape, l'algorithme part d'une valeur initiale des paramètres de population à estimer  $\Psi = \Psi_0$ . Pour une étape ( $k$ ) donnée, les paramètres issus de l'étape précédente ( $k - 1$ )  $\Psi_{k-1}$  sont utilisés comme point de départ. L'algorithme calcule un nouveau jeu de paramètres  $\Psi_k$  jusqu'à ce que le gradient de la fonction  $-2LL$  s'annule, autrement dit lorsque la vraisemblance est maximisée. L'algorithme s'arrête lorsque la différence entre les paramètres  $\Psi_k$  et  $\Psi_{k+1}$  devient inférieure à un seuil de tolérance préalablement fixé. Les paramètres finalement retenus  $\hat{\Psi}$  remplacent les paramètres initiaux  $\Psi_0$ .

## ***2. Approche du maximum de vraisemblance : la vraisemblance exacte***

Grâce au développement de l'informatique, de nouvelles méthodes basées sur le calcul intensif ont vu le jour et permettent une approximation de la vraisemblance si bonne qu'elle est considérée comme "exacte". Le calcul de la vraisemblance exacte repose sur deux approches, l'intégration numérique (que nous ne détaillerons pas ici) et l'intégration stochastique.

Parmi ces méthodes d'intégration stochastique, l'une des plus utilisées est l'algorithme SAEM (Stochastic Approximation of Expectation-Maximization) introduite en 1999 par Delyon [9] et améliorée quelques années plus tard par Kuhn et Lavielle [10].

Le principe de cet algorithme est présenté dans la figure A.3 pour l'estimation des paramètres typiques et individuels d'une population de trois individus.

A la toute première itération, la distribution  $\mathcal{D}$  des paramètres individuels  $\theta_i$  est obtenue à partir de valeurs initiales du paramètre typique  $\mu$  et de sa variance  $\omega^2$ . Dans notre exemple, le paramètre en question est la constante de croissance tumorale  $\lambda$  de valeur typique initiale  $\mu_0$ , et de variance initiale  $\omega_0^2$ .

Lors de l'étape S (Simulation), des paramètres individuels sont échantillonnés à partir de leur distribution conditionnelle obtenue par une méthode de Monte-Carlo avec Chaîne de Markov (MCMC). Le tirage de paramètres individuels est réalisé par un algorithme de Metropolis-Hastings. Cette étape permet donc d'obtenir ce que l'on appelle une moyenne conditionnelle  $\theta_i^{(k)}$  et une variance conditionnelle  $v_i^{(k)}$  du paramètre  $\lambda$  pour chaque individu  $i$  à l'itération ( $k$ ) avec ( $k = 1, \dots, n$ ).

Ces paramètres sont dits conditionnels car ils sont calculés en fonction des paramètres de populations  $\mu^{(k-1)}$  et  $\omega^{(k-1)}$  issues de l'itération ( $k - 1$ ).

A l'étape SA (Stochastic Approximation), la vraisemblance des données complètes est calculée par intégration stochastique.

L'étape M (Maximization), permet d'actualiser les paramètres de population en fonction de la vraisemblance obtenue à l'étape SA. A partir de ces nouveaux paramètres de population, on retourne à l'étape S et ainsi de suite.

Les paramètres de population finalement retenus  $\hat{\mu}$  et  $\hat{\omega}$  sont ceux obtenus lors de la dernière itération  $n$ .

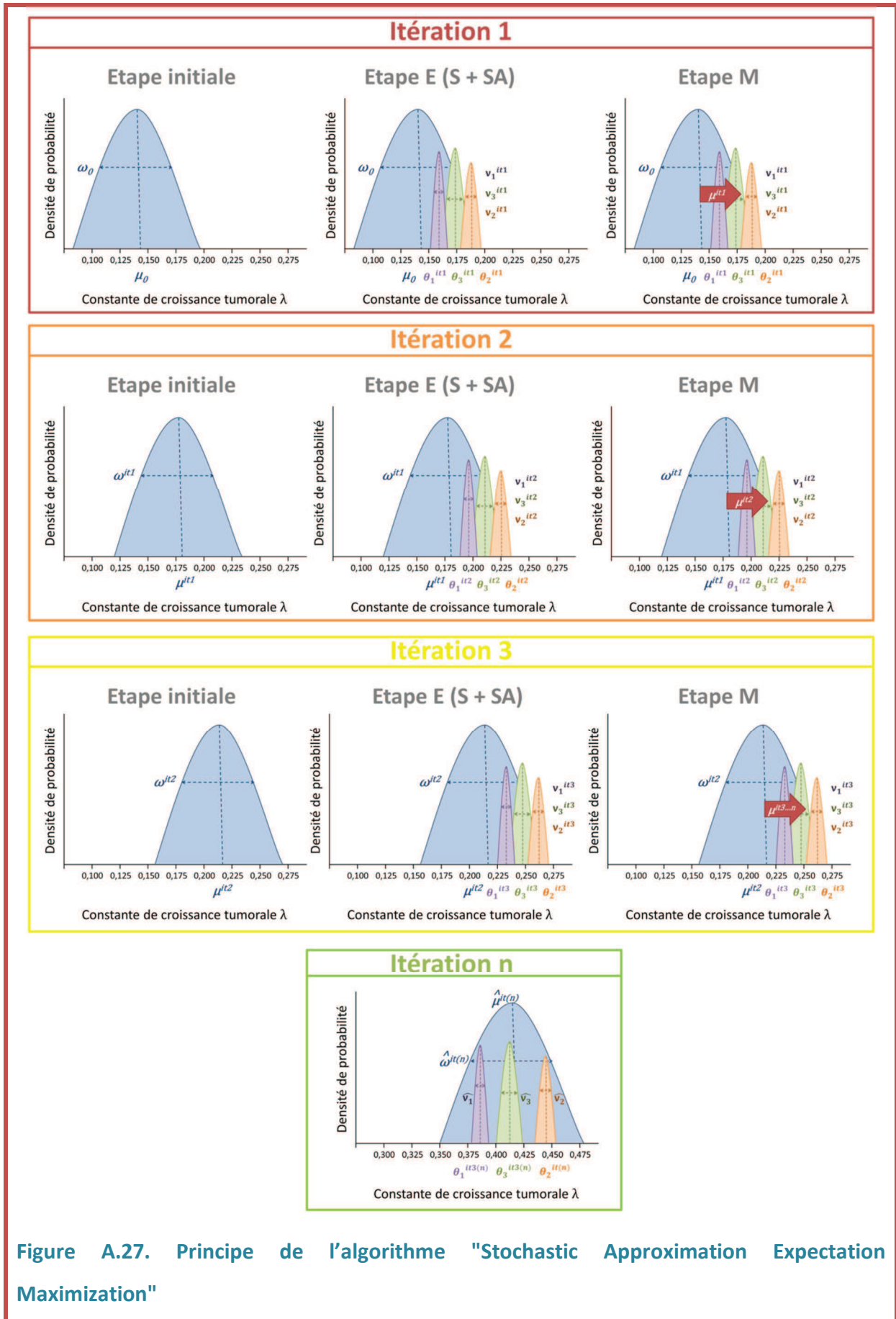


Figure A.27. Principe de l'algorithme "Stochastic Approximation Expectation Maximization"

La méthode SAEM est une méthode de choix pour l'estimation paramétrique. Cet algorithme permet une estimation plus rapide des paramètres car il nécessite moins d'itérations que les autres algorithmes EM. De plus, il permet de converger vers les paramètres finaux même si les paramètres initiaux fournis à l'algorithme sont éloignés de leur valeur finale. Enfin, cette méthode est adaptée pour l'analyse de tout type de données que ce soit des données catégorielles ou continues (riches ou éparées). L'algorithme SAEM a été implémenté dans le logiciel MONOLIX en 2004 ainsi que dans la version 7 du logiciel NONMEM sortie en 2009.

### 3. Approche Bayésienne

Dans l'analyse bayésienne, on cherche à maximiser la probabilité d'avoir les paramètres  $\Psi$  sachant les observations  $y$  à disposition. Cette analyse repose sur la formule de Bayes :

$$\begin{aligned}
 p(\Psi | y) &= \frac{p(y | \Psi)\pi(\Psi)}{p(y)} \\
 &= \frac{p(y | \Psi)\pi(\Psi)}{\int p(y | \Psi)\pi(\Psi)d\Psi}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

$\pi(\Psi)$  est la distribution *a priori* des paramètres de population  $\Psi$ . Une bonne sélection de l'information *a priori* permet de cibler des valeurs de paramètres que l'on pense plus probables. Cette information peut être obtenue à partir des estimations finales  $\widehat{\Psi}$  d'une première analyse de population. Si aucune information *a priori* n'est disponible,  $\pi(\Psi) = 1$ , on se place dans un contexte dit non-informatif.  $p(y | \Psi)$  correspond à la vraisemblance telle que nous l'avons décrite dans l'équation 4.  $p(y)$  est la distribution marginale des observations. Enfin,  $p(\Psi | y)$  est la distribution *a posteriori*.



Ainsi, pour un paramètre donné, l'analyse bayésienne permet d'obtenir toute sa distribution *a posteriori*. Différentes métriques permettent de résumer les informations issues de la distribution *a posteriori*.

La première métrique qui paraît évidente est le mode de la distribution qui n'est autre que la valeur de plus haute densité de probabilité. C'est ce que l'on appelle le MAP (Maximum A Posteriori). Pour faciliter les calculs, le MAP est calculé à partir de la distribution *a posteriori* non normalisée par la distribution marginale des observations (équation 7). On remarquera que dans un contexte non-informatif ( $\pi(\Psi) = 1$ ), le MAP revient au MLE (équation 5).

On peut s'intéresser à la médiane ou la moyenne de la distribution *a posteriori* dont les valeurs ne sont pas forcément celles de plus grande densité de probabilité.

$$\begin{aligned}\hat{\Psi}_{MAP} &= \underset{\Psi}{\operatorname{argmax}} p(\Psi | y) \\ &= \underset{\Psi}{\operatorname{argmax}} p(y | \Psi)\pi(\Psi)\end{aligned}\tag{7}$$

Le MAP peut être déterminé grâce à la méthode MCMC utilisant soit l'algorithme de Metropolis-Hastings soit l'échantillonneur de Gibbs qui ont tous les deux pour objectifs de créer une série d'échantillons dont la distribution est la distribution *a priori*.

La distribution *a posteriori* est intéressante lorsque l'on cherche à obtenir l'incertitude des paramètres estimés, en l'occurrence sur les paramètres individuels lorsque l'on veut réaliser des prédictions individuelles par exemple.

## C. Evaluation des modèles

Comme l'a si bien dit George E. Box dans son ouvrage de 1987, 'tous les modèles sont faux mais certains sont utiles' [11]. Ainsi, deux pharmacométriciens peuvent analyser le même jeu de données avec deux modèles complètement différents. Cela ne signifie pas que le modèle du pharmacométricien A est meilleur que celui de B, mais que le développement d'un modèle est un processus personnel qui répond à des objectifs précis qui conditionnent le choix de tel ou tel modèle. Néanmoins, que ce soit pour le pharmacométricien A ou B, les deux modèles doivent répondre à des critères d'évaluation permettant d'assurer la bonne qualité descriptive et/ou prédictive des modèles, ainsi que la bonne fiabilité et précision des résultats obtenus.

Par conséquent dans cette partie, nous allons présenter d'une part les diverses méthodes statistiques permettant de comparer des modèles entre eux ; et d'autre part les graphiques diagnostiques usuels permettant d'évaluer la qualité d'un modèle.

### **1. Comparaison de modèles sur des critères statistiques**

#### ***a. Critères basés sur la vraisemblance***

Les critères basés sur la vraisemblance sont très largement utilisés dans la communauté pharmacométrique pour la comparaison de deux ou plusieurs modèles. Les plus utilisés sont le test du rapport de vraisemblance et les critères d'information d'Akaike (AIC) ou bayésien (BIC).

Le test du rapport de vraisemblance permet de comparer des modèles emboîtés, c'est-à-dire deux modèles dont la structure est identique mais dont l'un comprend  $p$  ( $p = 1, \dots, n$ ) paramètres supplémentaires. Le modèle comprenant les  $p$  paramètres supplémentaires est dit complet tandis que l'autre est dit réduit. Les modèles PK I et III du tableau 1.1 sont des modèles emboîtés par exemple. Par conséquent, le test du rapport de vraisemblance cherche à calculer la quantité :

$$X = -2(LL_{réduit} - LL_{complet}) \text{ soit } X \sim \chi^2_p \quad (8)$$

Où  $LL_{réduit}$  et  $LL_{complet}$  sont les log-vraisemblances respectives du modèle réduit et du modèle complet.  $X$  suit une loi du  $\chi^2$  à  $p$  degrés de liberté. Cela revient au même que de faire la différence entre la fonction objective du modèle complet et celle du modèle réduit (où *fonction objective* =  $-2LL$ ). Par exemple, si le modèle complet comprend 1 paramètre supplémentaire par rapport au modèle réduit, il faut que la différence des fonctions objectives soit supérieure ou égal à 3,84 pour que l'ajout de ce paramètre dans le modèle complet représente un avantage significatif avec un risque  $\alpha$  de 5%. Sinon, les deux modèles sont considérés comme équivalents. Le tableau A.1 présente les valeurs significatives de  $X$  pour différents nombres de paramètres  $p$  et risques  $\alpha$ . En général, on utilise un risque  $\alpha$  de 5% lorsque l'on souhaite comparer deux modèles. L'inconvénient du test du rapport de vraisemblance, c'est qu'il ne permet de comparer que des modèles emboîtés. Pour exemple, un modèle de Simeoni ne peut pas être comparé avec un modèle logistique général (tableau 1.4) par ce test.

p	Risque $\alpha$	Valeur significative de X
1	5%	3,84
	1%	6,635
	0,1%	10,8
2	5%	5,99
	1%	9,21
	0,1%	13,8
3	5%	7,81
	1%	11,3
	0,1%	16,3
4	5%	9,49
	1%	13,3
	0,1%	18,5

**Tableau A.1. Valeurs significatives du test du rapport de vraisemblance en fonction du nombre de paramètres supplémentaires p et du risque  $\alpha$ .** Ces valeurs sont issues d'une table de  $\chi^2$ .

En 1974, Hirotugu Akaike introduit le critère d'information AIC [12].

$$AIC = -2LL + 2k \quad (9)$$

Où  $k$  représente le nombre de paramètres du modèle. Ce qui est intéressant avec l'AIC, c'est qu'il va pouvoir prendre en compte le nombre de paramètres d'un modèle et ses conséquences sur la qualité d'ajustement. Un modèle A comprenant  $p$  paramètres de plus qu'un modèle B décrira certainement mieux les données observées que le modèle B.

Cependant, l'information apportée par ces paramètres supplémentaires peut être inutile par rapport au modèle B moins paramétré. C'est cette perte d'information que juge l'AIC. Le choix entre les modèles portera sur celui qui possèdera la valeur d'AIC la plus faible. Ce critère présente l'avantage de pouvoir comparer deux modèles non emboîtés contrairement au test du rapport de vraisemblance. Ce n'est toutefois pas un test au sens statistique du terme : il n'existe pas de valeur prédéfinie pour laquelle un modèle est significativement meilleur qu'un autre (contrairement à la loi du  $\chi^2$  avec le test du rapport de vraisemblance).

En 1978, Gideon Schwarz modifie légèrement le critère AIC en pondérant la fonction objective par le nombre total d'observations  $N$  en plus du nombre de paramètres  $k$  du modèle [13] (équation 10). Ce critère est appliqué de manière similaire à l'AIC.

$$BIC = -2LL + \ln(N)k \quad (10)$$

### ***b. Précision des paramètres estimés***

La précision des paramètres est un critère indispensable pour évaluer la qualité des estimations. L'erreur standard relative ou RSE est exprimée en pourcent et correspond à :

$$RSE \% = 100 \times \frac{SE(\mu_p)}{\mu_p} \quad (11)$$

Où  $\mu_p$  est la valeur typique de population du paramètre  $p$  et  $SE(\mu_p)$  l'erreur standard d'estimation du paramètre  $\mu_p$ . Les RSE peuvent aussi être calculés pour les variances  $\omega_p^2$  du paramètre  $\mu_p$  correspondant et qui, pour rappel, quantifie l'IIV. La matrice des SE est obtenue à partir de l'inverse de la matrice d'information de Fisher qui est calculée par des méthodes différentes selon l'algorithme d'estimation utilisé.

## 2. Graphiques diagnostiques usuels

Les graphiques diagnostics sont des méthodes visuelles d'évaluation d'un modèle. Le tableau A.2 résume les graphiques diagnostics usuels souvent utilisés en routine et recommandés dans les recommandations de l'agence européenne des médicaments (EMA) [14].

Les courbes d'ajustement sont très utilisées puisqu'elles permettent directement de voir si le modèle structurel permet de capturer l'allure des données. On regardera surtout les prédictions individuelles (IPRED) et les observations (OBS) en fonction du temps. Si IPRED et OBS se superposent, le modèle décrit de façon adéquate les données, sinon, le modèle structurel est à revoir.

Une autre façon d'apprécier la qualité du modèle structurel est de regarder les IPRED en fonction des OBS. Dans les deux cas, les points doivent se répartir équitablement et se resserrer autour de la droite  $y = x$ .

Les résidus (RES) correspondent à l'écart entre les OBS et les prédictions de population typique (PRED). Ils ne sont pas intéressants pour l'évaluation des modèles car ils peuvent montrer une tendance même quand le modèle est bon [15]. Dans ce cas, on normalise les résidus en les divisant par leur variance afin qu'ils gardent la même valeur peu importe la taille de leur variance et ainsi éviter toute tendance explicable. C'est ce que l'on appelle les "weighted residuals" (résidus pondérés) ou WRES.

$$\begin{aligned}
 RES &= OBS - PRED & \text{soit } RES &\sim \mathcal{N}(0, \sigma^2) \\
 WRES &= \frac{RES}{\sigma^2} & \text{soit } WRES &\sim \mathcal{N}(0, 1)
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

Dénomination	Description	Allure du graphique
IPRED & OBS vs TEMPS	<ul style="list-style-type: none"> <li>C'est ce que l'on appelle le fit ou courbe d'ajustement.</li> <li>Elle permet d'apprécier la qualité descriptive du <u>modèle</u> en superposant les observations (points rouges) avec les prédictions individuelles (ligne bleue)</li> </ul>	
IPRED vs OBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evalue la qualité du <u>modèle</u> structurel <math>f</math> et des estimations individuelles</li> <li>Les points doivent se répartir uniformément et se resserrer autour de la droite <math>y = x</math></li> </ul>	
WRES vs PRED CWRES vs PRED	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evalue la qualité du <u>modèle</u> d'erreur <math>g</math> et par extension de <math>f</math> en fonction des prédictions</li> <li>Les points doivent se répartir de façon homogène autour de la droite <math>x = 0</math></li> </ul>	
WRES vs TEMPS CWRES vs TEMPS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evalue la qualité du <u>modèle</u> d'erreur <math>g</math> et par extension de <math>f</math> en fonction du temps</li> <li>Les points doivent se répartir de façon homogène autour de la droite <math>x = 0</math></li> </ul>	

Tableau A.2. Graphiques diagnostiques usuels.

Hooker *et al.* ont démontré que l'utilisation des CWRES (Conditional Weighted RESiduals) permettaient d'éviter les erreurs de diagnostic du modèle par rapport aux WRES [16]. A la différence des WRES, les CWRES sont calculés selon la méthode FOCE et sont plus fiables et performants pour évaluer les défauts du modèle. Ainsi on va s'intéresser à l'allure des CWRES en fonction des PRED. La répartition des CWRES doit être homogène autour de la droite  $x = 0$ . Si une tendance franche est observée, cela signifie que le modèle d'erreur, voire même le modèle structurel, n'est pas adapté pour bien décrire les données. Pour ce qui est des CWRES en fonction du temps, le principe reste le même, l'allure de la répartition permet de voir si des défauts existent en fonction du temps. En conclusion, les graphiques diagnostiques basés sur les résidus permettent de s'assurer que les résidus sont identiquement distribués et indépendants des prédictions et du temps.

Tous ces graphiques permettent une évaluation rapide et visuelle de la qualité du modèle et sont indispensables pour le processus de sélection et d'évaluation lors du développement d'un modèle. Evidemment, cette liste est loin d'être exhaustive et d'autres graphiques comme la distribution des  $\eta_{(p)}$  ou des CWRES par exemple peuvent être investigués.

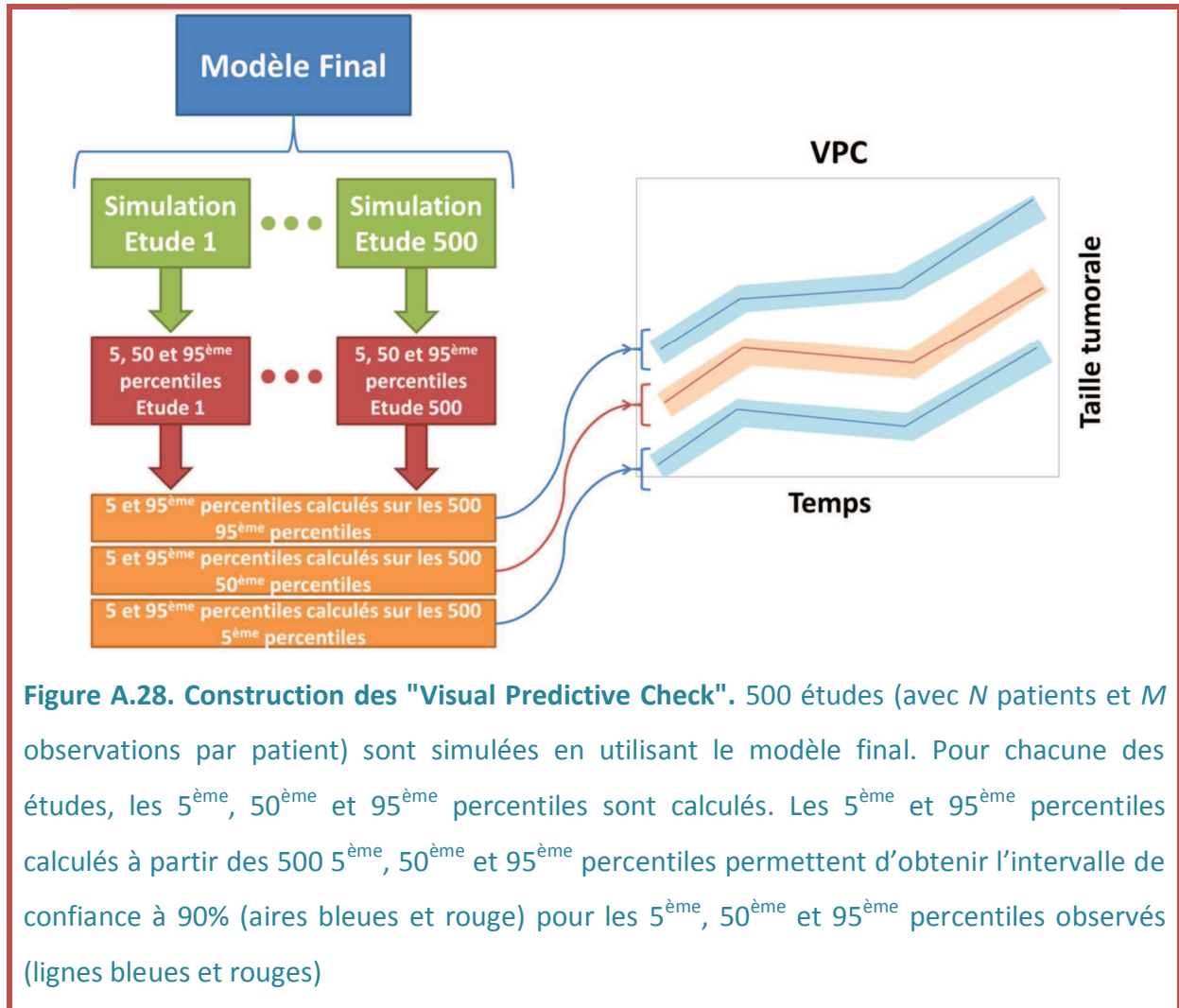
### **3. Graphiques diagnostiques avancés**

Dans cette partie, nous discuterons seulement des contrôles visuels des prédictions ou VPC (visual predictive check). Le VPC est une méthode d'évaluation visuelle dont le principe est de superposer les observations, et en particulier la médiane, les 5<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles, aux intervalles de confiance correspondants, calculés à partir de simulations



réalisées avec le modèle final (figure A.4). Chaque percentile est calculé pour un temps donné. Si les individus n'ont pas tous les mêmes temps d'observation, les VPC sont réalisés sur des intervalles de temps prédéfinis que l'on appelle "bin", de façon à ce que tous les "bins" contiennent un nombre d'observations similaire.

Le principe est donc d'évaluer de façon visuelle si les profils simulés par le modèle (représentés par les aires dans la figure A.4) sont capables de reproduire le profil médian observé (ligne rouge) ainsi que la variabilité des données (les lignes bleues). Les VPC permettent d'apprécier la qualité du modèle structurel en détectant les zones que le modèle ne parvient pas à décrire correctement. La largeur des intervalles de confiance de chacun des percentiles apporte une information sur la variabilité estimée ; ce qui permet de savoir si des covariables nécessitent d'être intégrées. Pour être interprétables, les VPC doivent être réalisés pour une population homogène, c'est-à-dire traitée par la même dose ou possédant les mêmes covariables. Si ce n'est pas le cas, il faut procéder à des stratifications des VPC en fonction des doses et/ou des covariables, tout en gardant à l'esprit qu'il faut que les données soient suffisantes dans chacun des groupes pour avoir des percentiles observés pertinents. C'est utile dans des études précliniques où différents groupes de doses sont comparés mais pas pour des études cliniques. En effet, il se peut que pour des raisons de tolérance, la dose administrée soit réduite et que les individus d'un même groupe de dose possèdent en fait des doses différentes. Dans ce cas, la différence de dose entre les individus ajoute une variabilité qui n'est pas expliquée par les effets aléatoires (IIV et erreur résiduelle) rendant obsolète l'utilité du VPC.



**Figure A.28. Construction des "Visual Predictive Check".** 500 études (avec  $N$  patients et  $M$  observations par patient) sont simulées en utilisant le modèle final. Pour chacune des études, les 5<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles sont calculés. Les 5<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles calculés à partir des 500 5<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles permettent d'obtenir l'intervalle de confiance à 90% (aires bleues et rouge) pour les 5<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles observés (lignes bleues et rouges)

C'est pourquoi en 2011 Martin Bergstrand, de l'équipe du Pr. Mats Karlsson, a mis au point les VPC corrigés par les prédictions de population ou pcVPC [17].

Dans un pcVPC, la variabilité apportée par les différences de doses, de covariables ou d'autres variables indépendantes dans un "bin" est supprimée en normalisant la variable dépendante (taille tumorale par exemple) observée et simulée par la PRED pour chaque "bin". Par conséquent, les pcVPC visualisent des observations et des simulations normalisées par la PRED (équation 13).

$$pcY_{ij} = lb_{ij} + (Y_{ij} - lb_{ij}) \cdot \frac{P\widetilde{RED}_{bin} - lb_{ij}}{PRED_{ij} - lb_{ij}} \quad (13)$$

Où  $Y_{ij}$  est la valeur observée ou simulée de l'individu  $i$  au temps  $j$ ,  $pcY_{ij}$  est la valeur observée ou simulée corrigée par la prédiction.  $PRED_{ij}$  est la prédiction de population typique de l'individu  $i$  au temps  $j$  et  $\widetilde{PRED}_{bin}$  la médiane de la prédiction de population typique pour un "bin".  $lb_{ij}$  est la limite inférieure de la PRED. C'est une astuce qui permet de prendre en compte le fait que certaines variables dépendantes puissent être négatives (comme le changement relatif à la valeur basale dont la limite inférieure est de  $-100\%$ ).

### III- PUBLICATION WILSON ET AL. 2015

## **Modeling and Predicting Optimal Treatment Scheduling Between the Antiangiogenic Drug Sunitinib and Irinotecan in Preclinical Settings**

S. Wilson<sup>1</sup>, M Tod<sup>2</sup>, A Ouerdani<sup>1</sup>, A Emde<sup>3</sup>, Y Yarden<sup>3</sup>, A Adda Berkane<sup>4</sup>, S Kassour<sup>4</sup>, MX Wei<sup>4</sup>, G Freyer<sup>2</sup>, B You<sup>2</sup>, E Grenier<sup>1</sup> et B Ribba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inria, project team NuMed, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.

<sup>2</sup> EMR 3738, Ciblage Thérapeutique en Oncologie, Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud, Université Lyon 1, Oullins, France.

<sup>3</sup> Department of Biological Regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

<sup>4</sup> CellVax Laboratory facility, Bâtiment Marcenac, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France.

## ORIGINAL ARTICLE

# Modeling and Predicting Optimal Treatment Scheduling Between the Antiangiogenic Drug Sunitinib and Irinotecan in Preclinical Settings

S Wilson<sup>1</sup>, M Tod<sup>2</sup>, A Ouerdani<sup>1</sup>, A Emde<sup>3</sup>, Y Yarden<sup>3</sup>, A Adda Berkane<sup>4</sup>, S Kassour<sup>4</sup>, MX Wei<sup>4</sup>, G Freyer<sup>2</sup>, B You<sup>2</sup>, E Grenier<sup>1</sup> and B Ribba<sup>1\*</sup>

We present a system of nonlinear ordinary differential equations used to quantify the complex dynamics of the interactions between tumor growth, vasculature generation, and antiangiogenic treatment. The primary dataset consists of longitudinal tumor size measurements (1,371 total observations) in 105 colorectal tumor-bearing mice. Mice received single or combination administration of sunitinib, an antiangiogenic agent, and/or irinotecan, a cytotoxic agent. Depending on the dataset, parameter estimation was performed either using a mixed-effect approach or by nonlinear least squares. Through a log-likelihood ratio test, we conclude that there is a potential synergistic interaction between sunitinib when administered in combination with irinotecan in preclinical settings. Model simulations were then compared to data from a follow-up preclinical experiment. We conclude that the model has predictive value in identifying the therapeutic window in which the timing between the administrations of these two drugs is most effective.

CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. (2015) 4, 720–727; doi:10.1002/psp4.12045; published online 11 December 2015.

## Study Highlights

WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?  The therapeutic combination of antiangiogenic drugs with chemotherapies is used to treat patients with colorectal cancer. The action of the antiangiogenic drug leads to a modification of the properties of the intratumoral vasculature network. Some studies have shown that antiangiogenic drugs can induce a normalization of the intratumoral vasculature followed by a reduction of blood flow. Since chemotherapy, which has a direct cytotoxic effect on tumor cells, reaches cancer cells by the blood vessel network, an interaction, favorable or unfavorable, between these two drugs is possible. • WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?  The objective was to quantify the dynamics of this interaction by using mathematical modeling in order to identify the best protocols of administration of an antiangiogenic drug, sunitinib, combined with a chemotherapy, irinotecan. • WHAT THIS STUDY ADDS TO OUR KNOWLEDGE  In the preclinical conditions we explored, there is a weak synergistic interaction between these drugs and, given a specific combination protocol, an optimal timing for the administration of irinotecan during sunitinib treatment. • HOW THIS MIGHT CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS  The model will be up-scaled to human in order to suggest new delivery protocols of this combination for improving the treatment of colorectal cancer patients.

The seminal work of Folkman describes the “angiogenic switch” that details how the growth of a tumor greatly depends on its ability to induce a vascular network capable of sustaining its growth.<sup>1</sup> Without initiating angiogenesis, tumors are destined to remain dormant at a diameter of 1–3 mm. Work in this area has progressed through the identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key factor in tumor growth and angiogenesis. This signaling protein promotes endothelial cell proliferation and migration and is overproduced by many types of cancer cells.<sup>2</sup>

A number of therapies designed to target angiogenesis have been developed. Bevacizumab, an antibody targeting the VEGF receptor, is approved for use in the treatment of different types of cancers.<sup>3</sup> Multitarget tyrosine kinase

inhibitors (TKIs) such as sunitinib<sup>4</sup> and sorafenib<sup>5</sup> are also potent antiangiogenic agents. While the potential benefits of targeting the angiogenesis process are apparent, the effects of combining such treatments with chemotherapeutic agents have yielded mixed results. For instance, in separate studies both Allegra *et al.* and Kindler *et al.* saw no significant improvement in disease-free survival or progression-free survival when bevacizumab was administered alone or in conjunction with chemotherapy in colon and pancreatic advanced cancer.<sup>6,7</sup> Some multitargeted TKIs, such as sunitinib, have been shown to be effective both as monotherapy and when used in conjunction with chemotherapy, but only in some solid tumors.<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Inria, project-team Numed, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup>EMR 3738, Ciblage Thérapeutique en Oncologie, Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud, Université Lyon 1, Oullins, France; <sup>3</sup>Department of Biological Regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel; <sup>4</sup>CellVax Laboratory facility, Bâtiment Marcenac, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France. \*Correspondence: B Ribba ([benjamin.ribba@gmail.com](mailto:benjamin.ribba@gmail.com))  
Received 30 July 2015; accepted 27 September 2015; published online on 11 December 2015. doi:10.1002/psp4.12045

The dynamics associated with treating cancer with antiangiogenic drugs are complex, in particular because of their potential to modify the properties of tumor vasculature. Some studies have reported a drug-induced vascular normalization within the tumor, leading to more effective drug delivery.<sup>9,10</sup> As an example, bevacizumab has been shown to increase the penetration of topotecan into a tumor by 81%.<sup>11</sup> On the other hand, these treatments also have the potential to destroy vasculature to the point of rendering the vasculature incapable of drug delivery.<sup>8</sup> These two phenomena, vasculature normalization and vasculature destruction, occur simultaneously. Thus far, scientific investigations have been insufficient to uncover the underlying mechanics of such complex phenomena. This motivates a model-based approach designed to understand the dynamic interactions between tumor progression, antiangiogenic drugs, and chemotherapeutic drugs. Using such an approach enables one to propose evidence-based combined therapeutic treatments designed to optimize the effectiveness of such treatments.

A number of mathematical models employing a number of different techniques have been developed that describe tumor growth with a theoretical antiangiogenic treatment.<sup>12–17</sup> Extensive work has been done in modeling tumor growth and treatment with a chemotherapeutic agent (see reviews<sup>18,19</sup>). Of particular relevance to this work, Simeoni *et al.*<sup>20</sup> present a model of tumor growth and treatment with the cytotoxic agent irinotecan. This work was followed by work in which synergistic interactions between the antiangiogenic agent bevacizumab and a number of chemotherapeutic compounds were evaluated using the Simeoni model.<sup>21</sup>

In the current work, we focus on the dynamics of tumor growth of HT-29 colorectal cancer (CRC) cells when two types of treatment are administered: the cytotoxic agent, irinotecan, and an antiangiogenic agent, sunitinib. This drug combination is of particular interest for a number of reasons: sunitinib failed a phase II clinical trial for the treatment of CRC,<sup>22</sup> thus leading to a stoppage in further clinical investigation of the drug in this indication. However, one can speculate that knowing how to optimally combine sunitinib with a chemotherapeutic agent could result in a synergistic effect caused by a proactive modification of the tumor vasculature enhancing chemotherapy accessibility within the tumor.

Our aim was to look closely to the preclinical properties of the antiangiogenic drug sunitinib to evaluate if optimally designed combination with a chemotherapy agent could result in a significant synergistic effect.

Given the common use of irinotecan in CRC (part of the FOLFIRI regimen) and given that irinotecan efficacy in xenografted mice has also been extensively modeled (see ref. 20 as an example), we selected this drug as a potential combination partner for sunitinib in CRC.

In patients eligible for sunitinib treatment (for example, in renal cell carcinoma), sunitinib is given orally on a daily basis. In the FOLFIRI regimen, irinotecan is given with slow intravenous infusion, one at a time, per chemotherapy cycle. Given these practical considerations, the question we addressed is the following: Is there an optimal time to

deliver a single dose of irinotecan during a 12-day administration of sunitinib?

## METHODS

### Overview

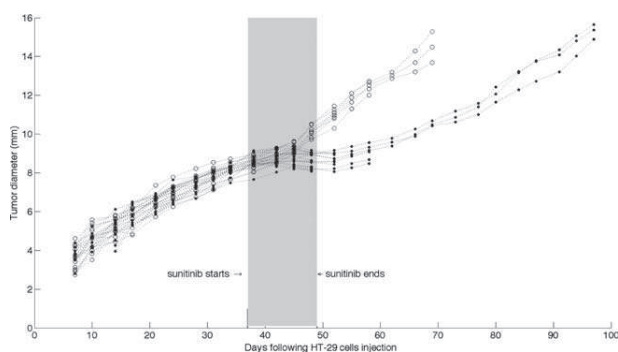
We first performed *in vitro* experiments to investigate the cytotoxic effects of sunitinib on HT-29 cells. The same HT-29 cells have been successively implanted in nude mice and interstitial fluid pressure—a marker of vasculature normalization<sup>10</sup>—has been measured (see **Supplementary Materials**). We developed a model that consists of a system of nonlinear ordinary differential equations (ODEs) and describe tumor growth and angiogenesis. We analyzed a dataset consisting of longitudinal tumor size measurements (1,371 total observations) in 105 colorectal tumor-bearing mice. Mice received single or combination administration of sunitinib and/or irinotecan. In the combination groups, sunitinib was given once daily for 12 days, with a single dose of irinotecan at day 2 or day 15. Sunitinib is modeled as acting by reducing the carrying capacity of the tumor, while irinotecan directly reduces the size of the tumor. Model parameters are estimated using a population approach using a stochastic approximation of the expectation-maximization algorithm (SAEM) using a simple least squares approach. We then evaluate the hypothesis that sunitinib and irinotecan interact synergistically when administered together. Finally, the model is used to predict the optimal timing of combined irinotecan and sunitinib treatment. The predictive ability of this model is validated with data from a follow-up experimental study. In the following sections we describe our methods in greater detail.

### *In vivo* experiment

Experimental subjects were athymic male mice, 5–6 weeks of age, weighing about 20 g each. Mice were maintained in cages with filter paper covers, sterilized food and bedding, and acidified water. All animal experiments were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication #85-23, revised 1985). HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells were grown in advance, trypsinized, counted, washed, and resuspended in serum for subcutaneous injection into the flank of mice. The injection condition was  $3.0 \times 10^6$  cells in 200  $\mu$ L. After injection, tumor measurements were made in each mouse once every 2–3 days for up to 9 weeks (**Figure 1**). Data collection consisted of three orthogonal tumor diameter measurements: length:  $l$ , width:  $w$ , and height:  $h$ , made using a slide caliper.

### Drug treatments

Treated animals were administered one or both of two therapeutic agents: irinotecan administered at 90 mg/kg 5-minute intravenous infusion or sunitinib administered at 40 mg/kg oral gavage. Two experiments were conducted for the purpose of model building. The first experiment was designed to determine the effectiveness of sunitinib monotherapy (see **Supplemental Table S1** for experimental protocol). This experiment included two arms: control and sunitinib treated (**Figure 1**). For the treatment arm of this experiment, sunitinib was administered once daily for 12



**Figure 1** Mean tumor diameter time course in HT-29 xenografted mice treated with sunitinib 40 mg/kg daily for 12 days (filled circles) or placebo (empty circles) in Experiment 1.

days. A second experiment was conducted to investigate the effects of combined therapy with sunitinib and irinotecan on tumor growth (see **Supplemental Table S2** for experimental protocol). There are five arms to this experiment: control, sunitinib monotherapy, irinotecan monotherapy, and two arms in which a combination of the two drugs was administered. In the combination groups, sunitinib was given once daily for 12 days, with a single dose of irinotecan at day 2 or day 15.

One experiment was conducted for the purpose of model evaluation. Here, sunitinib was administered for 12 consecutive days, during which there was a single administration of irinotecan on the 0th, 3rd, 6th, 9th, or 12th day of sunitinib treatment. The detailed protocol for this experiment is given in **Supplemental Table S4**.

### Modeling of tumor size

Following the logic presented previously,<sup>16</sup> we chose to model the mean of the three tumor diameter measurements. The use of mean tumor diameter is motivated by the fact that we intend that this model be used as the basis for a translational model, moving from the preclinical to the clinical setting. Because RECIST classifications of solid tumors in humans refer to linear tumor dimensions, we also use linear tumor dimensions here. Differing from the previous study,<sup>16</sup> however, we have chosen to consider the geometric mean of the length, width, and height measurements,  $(l \cdot w \cdot h)^{1/3}$ , as opposed to their arithmetic mean,  $\frac{l+w+h}{3}$ . This is motivated by the fact that the geometric mean incorporates information about the “height” of the tumor (the distance the tumor extends in the direction perpendicular to the body of the mouse) but also normalizes for the fact that this measurement typically lies in a different numerical range than those of the length and width of the tumor.

### Parameter estimation

The SAEM (Stochastic Approximation of the Expectation Maximization) algorithm was developed as an approach to solve the expectation maximization (EM) problem. Given a mathematical model, the goal is to determine the parameter

values that maximize the corresponding likelihood function. When appropriate, we use a naïve pooled mixed-effect approach. We utilize the SAEM algorithm implemented within the Monolix (Lixoft) software to estimate both population and individual parameters.

When the data were not amenable to mixed-effect parameter estimation techniques, we used standard least squares regression with the median tumor size data to estimate typical parameter values. To obtain least squares parameter estimations, ordinary differential equation solvers were coupled with minimization algorithms from the standard library of MatLab (MathWorks, Natick, MA).

### Model structure, selection, and evaluation

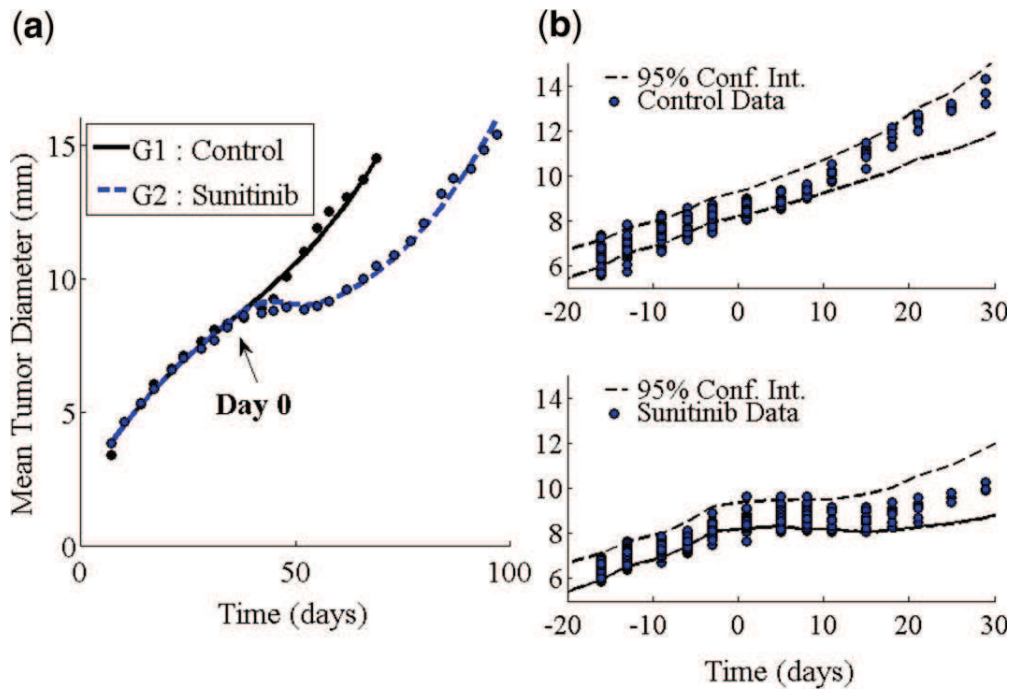
A number of model structures were considered. This included a number of tumor growth models such as exponential, linear, logistic, and Gompertzian growth. The current model is a modification of the classic model of Hahnfeldt *et al.*,<sup>14</sup> which includes tumor growth that is determined by a rate-limiting carrying capacity.

Model selection was done using a number of model evaluation criteria (Bayesian Information Criteria, Visual Predictive Check, likelihood values, standard errors on the parameters). The Bayesian Information Criteria (BIC) was used to compare and select between non-nested models. Candidate models resulting in lower BIC were selected over those with higher BIC. For a comparison between nested models, the log-likelihood ratio test was used to compare whether the likelihoods of two candidate models differ significantly from one another. After model selection was completed, the predictive value of the model was evaluated by comparing model simulations to a validation dataset.

## RESULTS

### Model of vascular tumor growth with sunitinib treatment

As an outcome of the same experiment, we report in **Figure 1** the time course of tumor size—measured as the mean tumor diameter—in mice treated with sunitinib (12 oral doses of 40 mg/kg daily) or not (control). Sunitinib is shown to produce a sustainable inhibition of tumor growth. There is clear evidence of tumor growth inhibition (i.e., treatment effectiveness) in the sunitinib group (filled circles) when compared to the control group (empty circles) with ~20-day delay in the time it takes for a tumor to reach a diameter of 10 mm. Given the results highlighting the non-cytotoxicity of sunitinib (see **Supplemental Data**), we can assume that sunitinib is primarily acting on the tumor endothelium and vasculature rather than on the HT-29 tumor cells to induce a strong inhibition of tumor growth. This noncytotoxic action is associated with a drop in the tumor interstitial fluid pressure (IFP) synonymous with a normalization of tumor vasculature, thus suggesting the existence of a potential optimal window to combine the sunitinib treatment with a classical chemotherapy agent (**Supplemental Data**).



**Figure 2** Sunitinib monotherapy model simulations. (a) Model simulation using average parameters. (b) Visual predictive check showing the 95% confidence interval generated by model simulation (dashed lines) and the tumor size data (circles) for the two experiment arms described in **Table S1**.

Following the spirit of the Hahnfeldt Model,<sup>14</sup> the model equations for the proposed model of tumor growth are as follows:

$$\begin{aligned} \frac{dD}{dt} &= \lambda \cdot D \cdot \left(1 - \left(\frac{D}{K}\right)^\alpha\right), \quad D(t=0) = D_0. \\ \frac{dK}{dt} &= b \cdot D^2, \quad K(t=0) = K_0. \end{aligned} \quad (1)$$

The mean tumor diameter  $D$  is assumed to grow following a generalized logistic growth law with varying carrying capacity. The tumor growth rate is represented by  $\lambda$ . The parameter  $\alpha$  is fixed to a value of 0.1, implying that the growth law is “nearly” Gompertzian. The variable  $K$ , known as the carrying capacity, describes the maximum capacity of tumor size. This variable represents tumor endothelium and vasculature providing nutrient and oxygen to tumor cells to grow. The rate constant associated with the creation of new vessels is  $b$ . The values of each of these parameters are given in **Supplementary Table S2**.

Next, we consider this model with the addition of antiangiogenic treatment. The variable  $S$  represents the total amount of sunitinib in the system. Due to the lack of pharmacokinetic data, we assume an exponential decay of sunitinib after each dose.<sup>23</sup> The model (1) together with the components related to sunitinib pharmacokinetic and pharmacodynamics are presented below:

$$\frac{dS}{dt} = -p_S \cdot S, \quad S(t = T_S) = 1.$$

$$\frac{dD}{dt} = \lambda \cdot D \cdot \left(1 - \left(\frac{D}{K}\right)^\alpha\right), \quad D(t=0) = D_0.$$

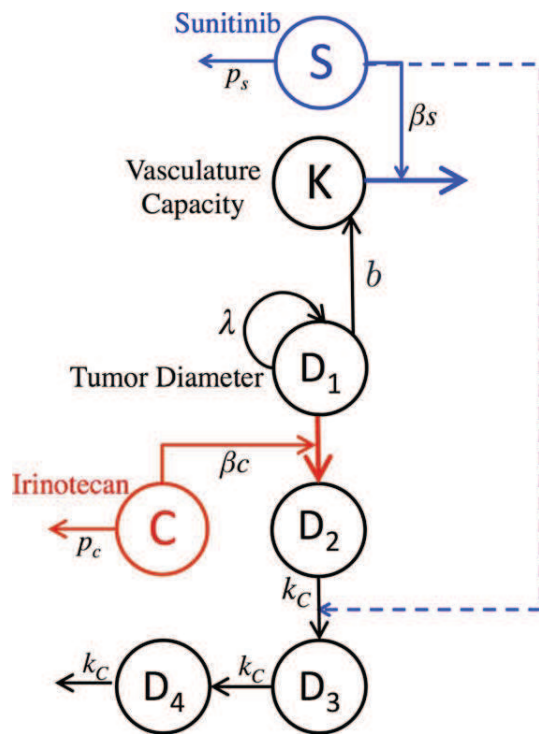
$$\frac{dK}{dt} = b \cdot D^2 - \beta_S \cdot p_S \cdot S \cdot K, \quad K(t=0) = K_0. \quad (2)$$

Given previous results where sunitinib was shown not to induce HT-29 cells death *in vitro*, we assumed the drug only to affect the tumor vasculature variable  $K$ .

The activity of sunitinib is proportional to its dosing rate  $p_S \cdot S$ . The elimination constant associated with sunitinib is  $p_S$  and the effectiveness of sunitinib is represented by  $\beta_S$ . Sunitinib treatment is given once a day for 12 consecutive days. Due to the lack of pharmacokinetic data, we consider each dose as having a normalized magnitude of 1.

Parameters of this model are estimated using the SAEM algorithm. The values of the parameters can be seen in **Supplementary Table S2**. **Figure 2a** shows a comparison of the model simulation to the average data in both the control (black) and treatment (blue) cases. There is good agreement between the data and simulations, leading us to believe that we have captured important dynamics associated with antiangiogenic therapy. Further model diagnostics are shown in **Figure 2b**. Here we show the visual predictive check associated with the two arms of the experiment. The dashed line outlines the 95% confidence interval determined by model simulation. Later timepoints (past 20 day) might show some level of misclassification due to the lack of data for these timepoints. Despite this, the experimental data are shown to be well confined by this interval in both the control (upper panel) and treated (lower panel) cases. Also, the individual parameter estimation is associated with





**Figure 3** Schematic representation of sunitinib-irinotecan combination model. Inclusion of the dashed line represents the final model in which the two drugs interact, while exclusion of this line represents a model in which irinotecan and sunitinib are assumed to act independently of each other.

an epsilon shrinkage of 7.6%, giving confidence to the notion that the data have not been overfit.

### Model of vascular tumor growth with combined sunitinib-irinotecan treatment

The natural way to model the combination of sunitinib-irinotecan is to assume simple additivity of the effect. We model the effects of irinotecan by following the work of Simeoni *et al.*<sup>20</sup> The variable  $C$  represents the total amount of irinotecan in the system. In a similar fashion to how sunitinib is modeled, the activity of irinotecan is proportional to its dosing rate  $p_C \cdot C$ . The elimination constant associated with irinotecan is  $p_C$  and the effectiveness of irinotecan is represented by  $\beta_C$ . We consider that irinotecan kills tumor cells through a three-stage death process represented mathematically by tumor cells passing through three transit compartment equations ( $D_2, D_3, D_4$ ) prior to leaving the system. The resulting model, schematically represented in **Figure 3** and for which equations are given below, is called the “noninteraction” model.

$$\frac{dC}{dt} = -p_C \cdot C, \quad C(t = T_C) = 1.$$

$$\frac{dS}{dt} = -p_S \cdot S, \quad S(t = T_S) = 1.$$

$$\frac{dD_1}{dt} = \lambda \cdot D_1 \cdot \left(1 - \left(\frac{D_1}{K}\right)^\alpha\right) - \beta_C \cdot p_C \cdot C \cdot D_1, \quad D_1(t=0) = D_0.$$

$$\frac{dD_2}{dt} = \beta_C \cdot p_C \cdot C \cdot D_1 - k_C \cdot D_2,$$

$$\frac{dD_3}{dt} = k_C \cdot D_2 - k_C \cdot D_3,$$

$$\frac{dD_4}{dt} = k_C \cdot D_3 - k_C \cdot D_4$$

$$\frac{dK}{dt} = b \cdot D_1^2 - \beta_S \cdot p_S \cdot S \cdot K, \quad K(t=0) = K_0.$$

$$D = D_1 + D_2 + D_3 + D_4. \quad (3)$$

Given the evidence of a decrease in tumor IFP during sunitinib treatment—thus potentially indicating tumor vasculature normalization—we also considered a model in which these two drugs interact with each other within the system, referred to as the “interaction model.” If sunitinib acts by normalizing tumor vasculature, it may result in an improved blood flow within the tumor. As cells need energy and oxygen to induce programmed cell death following DNA injuries by a cytotoxic agent, we hypothesized that sunitinib could increase the speed by which cells die once affected by irinotecan. We thus assumed that when the drugs are given concurrently,  $k_C$  is proportional to the cumulated exposure to sunitinib prior to the dose of irinotecan. The time of the administration of irinotecan is represented by the variable  $T_C$ . The “interaction model” has the same representation as model (3) where:

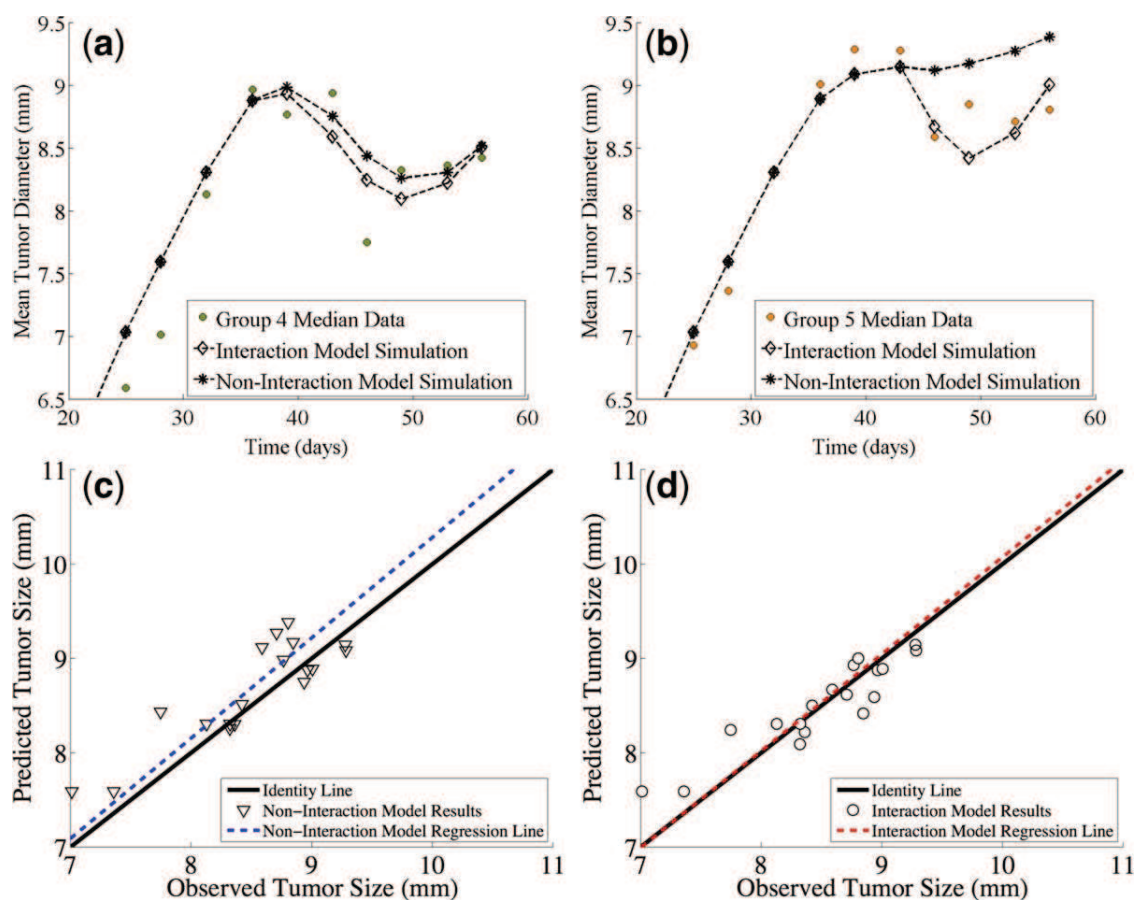
$$k_C = k_S \cdot \exp\left(\int_0^{T_C} S(t) dt\right) \quad (4)$$

The exponential in expression 4 was chosen to produce a relation similar to that of an exponential covariate in the mixed-effect approach. While this approach is empirical in the current modeling context, should we be able to use the mixed-effect approach with a similar dataset in the future, we hypothesize that the exponential covariate would be the most likely relation between these two quantities.

To estimate model parameters, we performed a new experiment described in **Supplemental Table S3**. Parameters were fit to the median data of each experimental group

**Table 1** Parameter estimates of experiment #2

Parameter	Estimate (% RSE)
$D(t=0)$ (mm)	0.29 (fixed)
$K(t=0)$ (mm)	7.43 (fixed)
$\lambda$ ( $\text{day}^{-1}$ )	1.34 (10)
$b$ ( $\text{mm}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ )	0.0027 (0.04)
$p_S$ ( $\text{day}^{-1}$ )	2.12 (fixed)
$\beta_S$ (conc. $\text{unit}^{-1}$ )	0.0317 (0.31)
$p_C$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.0850 (fixed)
$\beta_C$ (conc. $\text{unit}^{-1}$ )	0.3847 (5)
$k_S$ (unitless)	0.155 (6)



**Figure 4** Experiment 2. A comparison of the predictions of the noninteraction and interaction models. (a) Comparison of the simulations of both the noninteraction and interaction models along with the data of Group 4 (combination sunitinib with irinotecan on day 2). (b) Comparison of the simulations of both the noninteraction and interaction models along with the data of Group 5 (combination sunitinib with irinotecan on day 15). (c) Observed tumor sizes vs. the simulated tumor sizes for the noninteraction model. (d) Observed tumor sizes vs. the simulated tumor sizes for the interaction model.

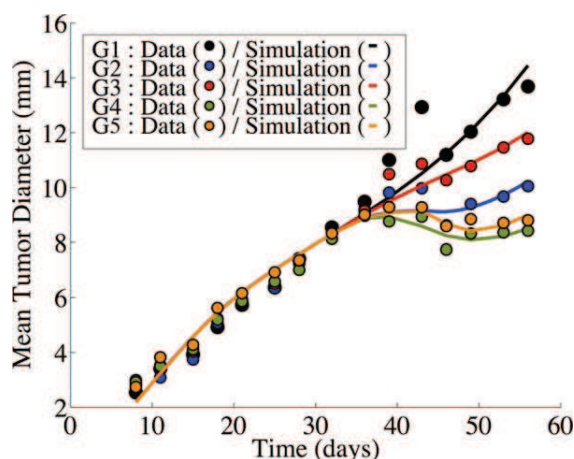
using nonlinear least squares regression. The final parameter values are given in **Table 1**.

**Figure 3** provides a schematic view of the sunitinib-irinotecan combination model, while **Figure 4** shows a comparison of the noninteraction and the interaction models. In **Figure 4a**, we show a comparison of the simulations of both the noninteraction and interaction models along with the data of Group 4 (combination sunitinib with irinotecan on day 2). In **Figure 4b**, we show a comparison of the simulations of both the noninteraction and interaction models along with the data of Group 5 (combination sunitinib with irinotecan on day 15). While the argument can be made for both models accurately describing the data of Group 4, it is clear that the noninteraction model does not capture the phenomenon observed for the data of Group 5. We continue by quantifying the observation that the interaction model more accurately describes our data. We show the observed tumor sizes vs. the simulated tumor sizes for the noninteraction model (**Figure 4d**) and interaction model (**Figure 4c**). We then consider the least squares linear fit of these data. Visually, it is clear that the regression line of the interaction model (**Figure 4d**) is more closely aligned with the identity line than

the noninteraction model (**Figure 4c**). This is evidence that the interaction model might be better suited to our data. Since the interaction model is nested within the noninteraction model, a log-likelihood ratio test was performed to determine if the difference in likelihoods is statistically significant. The result of the test shows a change in likelihood equal to  $-5.99$ . This indicates that the interaction model fits the data significantly better ( $P < 0.05$ ) than the noninteraction model. The simulation of Experiment 2 with the interaction model is shown in **Figure 5**, where we see good concordance between model and data in all five arms of the experiment.

#### Model evaluation

To further evaluate the model, we tested the ability of the model to adapt to the data arising from a separate experiment involving the same types of tumors and treatments. Following the experimental protocol given in **Supplemental Table S4**, sunitinib was administered for 12 consecutive days, during which there was a single administration of irinotecan on the 0th, 3rd, 6th, 9th, or 12th day of sunitinib treatment. Both simulation and experiment agree on the same optimal treatment protocol: the one in which irinotecan is

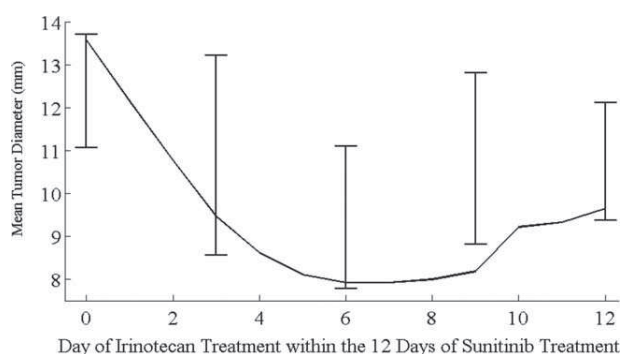


**Figure 5** Numerical simulation of Experiment 2 (Supplementary Table S2). Simulations are the result of the interaction model. The five arms to this experiment are as follows: control (black), sunitinib monotherapy (blue), irinotecan monotherapy (red), and two combination protocols. Group 4 (green) involves sunitinib being given once daily for 12 days, with a single dose of irinotecan at day 2. Group 5 (orange) involves sunitinib being given once daily for 12 days, with a single dose of irinotecan at day 15.

administered on the 6th day of sunitinib treatment. In Figure 6 we show the minimal tumor size achieved after treatment is started (nadir), with interindividual variability (one standard error) with respect to the day of irinotecan starts within the 12 days of sunitinib treatment. The continuous line represents the results of the simulation of the experiment using parameters in Table 1. Despite different tumor size values, the model qualitatively correctly predicts that the best day for irinotecan administration was day 6.

## DISCUSSION

In this work we developed a model of tumor growth in the case of combined therapy with antiangiogenic and chemo-



**Figure 6** Experiment 3. Minimal tumor diameter achieved (y-axis) in mice treated with sunitinib 40 mg/kg daily for 12 days in combination with irinotecan 90 mg/kg (unique 5-minute intravenous infusion) given at different time (x-axis) in the evaluation experiment (Supplemental Table S4). Error bars represent one standard deviation of experimental data, while continuous line represents the model prediction.

therapeutic drugs. Model development was guided by pre-clinical *in vivo* experiments with HT-29 colorectal tumor cells treated with sunitinib and irinotecan. Our model describes the growth of the tumor diameter as a generalized logistic function with a varying carrying capacity and can be viewed as a simplification of the model by Hahnfeldt *et al.*<sup>14</sup> Treatment with the antiangiogenic drug is modeled as decreasing the carrying capacity of the tumor, while treatment with irinotecan is modeled as a three-stage death process taking place directly on the tumor cells, as described in ref. 20.

One of the major questions when modeling multiple treatments is whether or not the treatments interact synergistically, antagonistically, or independently from each other. Our model, combined with a log-likelihood ratio test suggests that, in this setting, there is a possible weak synergistic interaction between sunitinib and irinotecan. While the findings of a drug interaction are consistent with the findings described,<sup>24</sup> it is inconsistent with some other modeling work (Terranova *et al.*,<sup>24</sup> who found no interaction. These varied conclusions are unsurprising, in that they reflect the mixed findings concerning the effectiveness of sunitinib in the clinical setting. These results highlight the need for more work to be done to understand how these drugs work individually and in combination. Furthermore, there is no single way to define synergism and antagonism. Depending on the definition the results might be different.<sup>25</sup>

Given that our model accurately models our data, it is possible to ask questions about the best timing of the two treatments. In both data and simulations, we found that the minimum final tumor size is reached when irinotecan was administered on the 6th day of sunitinib administration. This supports the notion that a “vasculature-normalizing window” occurs in the range between the 4th and 8th day of sunitinib treatment, with the best time for administering chemotherapy occurring during this window. Biologically, our experiments are consistent with the findings of Jain *et al.*, who detail evidence of such a treatment window in antiangiogenic drugs.<sup>8</sup> The numerical result is similar to the results of ref. 15, where the model indicated that the ideal time frame for chemotherapy administration existed in the range of 4–7 days after the start of sunitinib administration.

There are a number of ways in which this model may be modified or improved. First, the addition of pharmacokinetic data from our drugs could foster the development of a full pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model. We suspect that the addition of pharmacokinetic models will not significantly change the timescales or the nature of the interaction. However, we feel that the qualitative information gleaned from this model will hold even with the full PK-PD framework. However, a full PK-PD model would be needed to predict things like dose magnitude and toxicity. The model could be made more complex to investigate more biologically complex questions. For instance, one could consider a heterogeneous tumor consisting of different types of cells,<sup>16</sup> or even a more spatial model.<sup>15</sup>

It is also of note that we investigate “one cycle” of treatment. Now that we have identified the optimal combined treatment for a single cycle of irinotecan/sunitinib treatment, it would be of interest to investigate both experimentally

and numerically whether this treatment protocol remains optimal when given in multiple cycles.

Despite drastic simplification of the representative biological mechanisms, much can be gleaned from mechanistic models such as the one presented here. Our model suggests that synergism between irinotecan and sunitinib might be a consideration for future studies. In the future, this model could be used as a simulation tool to guide future pre-clinical experiments concerning these two drugs. Finally, this model could also be used to guide the development of a clinical model of CRC treatment with sunitinib and irinotecan. Information gleaned from this preclinical model could aid in increasing overall treatment efficacy by suggesting protocols based on the identification of optimal treatment windows between antiangiogenic and chemotherapeutic drugs.

**Acknowledgments.** The research leading to these results received support from INSERM (grant from Physicancer 2011). The work was also partly funded by the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no. 115156, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in kind contribution. The DDMoRe project is also supported by financial contributions from Academic and SME partners. This work does not necessarily represent the view of all DDMoRe partners.

**Conflict of Interest.** No conflicts of interest to declare.

**Author Contributions.** B.R., S.W., M.T., and A.O. wrote the article; B.R., S.W., M.T., A.O., Y.Y., A.A.B., M.X.W., G.F., B.Y., and E.G. designed the research; B.R., S.W., M.T., A.O., A.E., Y.Y., A.A.B., S.K., and M.X.W. performed the research; B.R., S.W., M.T., A.O., A.E., and Y.Y. analyzed the data.

1. Folkman, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* **29**(6 suppl. 16), 15–18 (2002).
2. Hicklin, D.J. & Ellis, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **23**(5), 1011–1027 (2005).
3. Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**(5), 391–400 (2004).
4. Chow, L.Q. & Eckhardt, S.G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J. Clin. Oncol.* **25**(7), 884–896 (2007).
5. Hasskarl, J. Sorafenib: targeting multiple tyrosine kinases in cancer. *Recent Results Cancer Res.* **201**, 145–164 (2014).
6. Allegra, C.J. *et al.* Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J. Clin. Oncol.* **29**(1), 11–16 (2011).
7. Kindler, H.L. *et al.* Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J. Clin. Oncol.* **28**(22), 3617–3622 (2010).

8. Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W. & Loeffler, J.S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**(1), 24–40 (2006).
9. Koukourakis, M.I. *et al.* Early antivascular effects of bevacizumab anti-VEGF monoclonal antibody on colorectal carcinomas assessed with functional CT imaging. *Am. J. Clin. Oncol.* **30**(3), 315–318 (2007).
10. Willett, C.G. *et al.* Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* **10**(2), 145–147 (2004).
11. Dickson, P.V. *et al.* Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**(13), 3942–3950 (2007).
12. Anderson, A.R. & Chaplain, M.A. Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. *Bull. Math. Biol.* **60**(5), 857–899 (1998).
13. d'Onofrio, A., Gandolfi, A. & Rocca, A. The dynamics of tumour-vasculature interaction suggests low-dose, time-dense anti-angiogenic schedulings. *Cell Prolif.* **42**(3), 317–329 (2009).
14. Hahnfeldt, P., Panigrahy, D., Folkman, J. & Hlatky, L. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res.* **59**(19), 4770–4775 (1999).
15. Lignet, F. *et al.* Theoretical investigation of the efficacy of antiangiogenic drugs combined to chemotherapy in xenografted mice. *J. Theor. Biol.* **320**: 86–99 (2013).
16. Ribba, B. *et al.* A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *Eur. J. Cancer* **47**(3), 479–490 (2011).
17. Sachs, R., Hlatky, L. & Hahnfeldt, P. Simple ODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment. *Math. Comput. Model.* **33**(12–13), 1297–1305 (2001).
18. Ribba, B. *et al.* A review of mixed-effects models of tumor growth and effects of anti-cancer drug treatment used in population analysis. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* **3**: e113 (2014).
19. Simeoni, M., De Nicolao, G., Magni, P., Rocchetti, M. & Poggese, I. Modeling of human tumor xenografts and dose rationale in oncology. *Drug Discov. Today Technol.* **10**(3), e365–372 (2013).
20. Simeoni, M. *et al.* Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res.* **64**(3), 1094–1101 (2004).
21. Rocchetti, M. *et al.* Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth after administration of an anti-angiogenic agent, bevacizumab, as single-agent and combination therapy in tumor xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**(5), 1147–1157 (2013).
22. Saltz, L.B. *et al.* Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *J. Clin. Oncol.* **25**(30), 4793–4799 (2007).
23. Jacqmin, P. *et al.* Modelling response time profiles in the absence of drug concentrations: definition and performance evaluation of the K-PD model. *J. Pharmacokinetic Pharmacodyn.* **34**(1), 57–85 (2007).
24. Terranova, N., Germani, M., Del Bene, F. & Magni, P. A predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic model of tumor growth kinetics in xenograft mice after administration of anticancer agents given in combination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**(2), 471–482 (2013).
25. Greco, W.R., Bravo, G. & Parsons, J.C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* **47**(2), 331–385 (1995).

© 2015 The Authors CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Supplementary information accompanies this paper on the *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* website (<http://www.wileyonlinelibrary.com/psp4>)

## IV- REFERENCES

1. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL (1972) Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res* 5:441–459. doi: 10.1016/0010-4809(72)90051-1
2. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe V V. (1977) Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 5:445–479. doi: 10.1007/BF01061728
3. Beal S, Sheiner LB (1980) The Nonmem System. *Am Stat* 34:118–119.
4. Beal S, Sheiner LB (1982) Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng* 8:195–222.
5. Lindstrom M, Bates D (1990) Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* 46:673–687.
6. Ramos RQ, Pantula SG (1995) Estimation of nonlinear random coefficient models. *Stat Probab Lett* 24:49–56. doi: 10.1016/0167-7152(94)00147-Z
7. Vonesh E (1996) A note on the use of Laplace's approximation for nonlinear mixed-effects models. *Biometrika* 83:447–452. doi: 10.1093/biomet/83.2.447
8. Ge Z, J. Bickel P, A. Rice J (2004) An approximate likelihood approach to nonlinear mixed effects models via spline approximation. *Comput Stat Data Anal* 46:747–776.

- doi: 10.1016/j.csda.2003.10.011
9. Delyon B, Lavielle M, Moulines E (1999) Convergence of a stochastic approximation version of the EM algorithm. *Ann Stat* 27:94–128. doi: 10.2307/120120
  10. Kuhn E, Lavielle M (2005) Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Data Anal* 49:1020–1038. doi: 10.1016/j.csda.2004.07.002
  11. Box GE., Draper NR (1987) *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. John Wiley & Sons, New-York
  12. Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19:716–723. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705
  13. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6:461–464.
  14. European Medicine Agency (2007) *Guideline on Reporting the Results of Population Pharmacokinetic*.
  15. Karlsson MO, Savic RM (2007) Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther* 17–20. doi: 10.1038/sj.clpt.2007.6100241
  16. Hooker AC, Staats CE, Karlsson MO (2007) Conditional weighted residuals (CWRES): A model diagnostic for the FOCE method. *Pharm Res* 24:2187–2197. doi: 10.1007/s11095-007-9361-x
  17. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO (2011) Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 13:143–51. doi: 10.1208/s12248-011-9255-z

# GLOSSAIRE

Anticorps monoclonal humanisé	Population d'anticorps issus d'une unique lignée de cellules et de partie variable homogène qui ne reconnaît qu'un seul type d'antigène. Il est dit humanisé lorsque ses parties constantes sont d'origine humaine.
Angiogenèse	Phénomène par lequel se développent de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants.
Autophagie	Phénomène par lequel une cellule dégrade une partie de son cytoplasme avec ses propres lysosomes.
Biophase	Site d'action pharmacologique d'une molécule.
Clairance	Capacité de l'organisme à éliminer une molécule. Par définition, la clairance correspond au volume de plasma totalement épuré de la molécule par unité de temps.
Compartiment	Espace virtuel dans lequel se distribue une variable observée (concentration d'un médicament, taille tumorale, etc.) de façon homogène et instantanée.
Hypoxie cellulaire	Réduction de la quantité d'oxygène qu'utilisent les cellules.
Modèle	Représentation mathématique permettant de décrire un phénomène biologique ou pharmacologique.
Nadir	Partie la plus basse d'une courbe.

Normoxie cellulaire	Quantité d'oxygène nécessaire au fonctionnement normal d'une cellule.
Pharmacocinétique	Effets que l'organisme exerce sur le médicament. Elle étudie les processus d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion du médicament.
Pharmacodynamique	Effets que le médicament exerce sur l'organisme.
Pharmacométrie	Science pluridisciplinaire permettant l'analyse des effets pharmacologiques du médicament. Elle permet l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité du médicament grâce à des approches mathématiques et statistiques dans le but de faciliter leur développement.
Protéasome	Complexe enzymatique permettant de dégrader les protéines qui lui sont adressées.
Protéine de fusion	Protéine produite à partir de la combinaison de différentes protéines ou partie de protéines.
Puissance	En pharmacologie, la puissance d'une molécule se réfère à sa capacité à atteindre un effet maximal en fonction de sa concentration. L' $EC_{50}$ permet de quantifier la puissance d'une molécule. Plus elle sera faible et plus la molécule sera puissante.
Quasi-équilibre	Hypothèse selon laquelle il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres d'une molécule A et sa cible B et le complexe A/B suite à l'administration de la molécule A. Autrement dit les concentrations de A, B et A/B ne varient pas lorsqu'ils sont en équilibre.



Quasi-stationnaire

Dans un état stationnaire, seul la concentration du complexe A/B est constante puisque le processus de formation/dissociation du complexe est aussi rapide que le processus d'élimination du complexe.

Volume de distribution

Volume représentant l'espace théorique dans lequel le médicament se distribue.

## **Résumé :**

En l'espace d'une quarantaine d'années, les connaissances sur l'angiogenèse tumorale ont littéralement explosé. Dans les années 1970, Judah Folkman démontre que les tumeurs ont besoin d'être vascularisées pour continuer à proliférer. Peu de temps après, les protagonistes principaux de l'angiogenèse tumorale ont été découverts, de même que les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués. La décennie suivante marque le début des recherches sur les molécules à visée anti-angiogénique et c'est en 2004 que le bevacizumab (Avastin, Roche), premier médicament anti-angiogénique utilisé en oncologie, voit le jour. Parallèlement à cela, l'essor de la modélisation à effets-mixtes couplé aux progrès des outils informatiques ont permis de développer des méthodes d'analyses de données de plus en plus performantes. Dès 2009 L'agence de régulation FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis a identifié le rôle central de la modélisation numérique pour mieux analyser les données d'efficacité et de toxicité, préclinique et clinique en cancérologie. Le but de ce projet est d'étudier les effets de différents inhibiteurs de l'angiogenèse sur la dynamique tumorale, en se basant sur une approche populationnelle. Les modèles développés seront des modèles à base d'équations différentielles ordinaires intégrant des données et des informations issues de la littérature. L'objectif de ces modèles est de caractériser la dynamique des tailles tumorales chez les animaux et chez les patients, afin de comprendre les effets des traitements anti-angiogéniques et apporter un soutien pour le développement de ces molécules ou pour la prise de décisions thérapeutiques par les cliniciens.

## **Abstract:**

Within the last 40 years, knowledge of tumor angiogenesis has literally exploded. In the seventies, Judah Folkman demonstrated that tumors need to be vascularized to continue to proliferate. Shortly after, the main protagonists of tumor angiogenesis have been discovered, as well as the mechanisms in which they are involved. The next decade is the beginning of the research on molecules with anti-angiogenic effects and in 2004 bevacizumab (Avastin, Roche), the first antiangiogenic drug used in oncology, was available for treating solid cancer patients. Along with this, the increasing interest of mixed-effects modeling coupled with advances in computer tools allowed developing more efficient methods of data analysis. In 2009, the regulatory agency FDA (Food and Drug Administration) in the United States has identified the central role of numerical modeling to better analyze the efficacy and toxicity preclinical and clinical oncology data. The aim of this project is to study the effects of different angiogenesis inhibitors on tumor dynamics, based on a population approach. The developed models are models based on ordinary differential equations and that integrate data and information from the literature. The objective of these models is to characterize the dynamics of tumor sizes in animals and patients in order to understand the effects of anti-angiogenic treatments and provide support for the development of these molecules, or to help clinicians for therapeutic decision making.