

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2001

THESE N° 334

**MODELE ANIMAL
D'ETUDE CHRONOPHARMACOCINETIQUE
DES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX**

Thèse pour le
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 19 Septembre 2001

Par

Aurélie PREMAUD

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Gérard LACHATRE.....Président
Mme le Docteur Annick ROUSSEAUJuge
M. le Professeur Pierre MARQUETJuge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard

ASSESEURS: Madame le Professeur CHULIA Dominique
Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy

BASLY Jean-Philippe

BATTU Serge

BOTINEAU Michel

CARDI Patrice

CLEDAT Dominique

COMBY Francis

DELEBASSEE Sylvie

DREYFUSS Marie-Françoise

EA KIM Leng

FAGNERE Catherine

FROISSARD Didier

FOURNIER Françoise

JAMBUT Anne Catherine

LAGORCE Jean-François

LARTIGUE Martine

LOTFI Hayat

MARION Sandrine

MOREAU Jeanne

PARTOUCHE Christian

ROUSSEAU Annick

SIMON Alain

TROUILLAS Patrick

VIANA Marylène

VIGNOLES Philippe

PHARMACOGNOSIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

PHYSIOLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PHARMACODYNAMIE

THERAPEUTIQUE

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

BIOCHIMIE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

CHIMIE ORGANIQUE

PHARMACODYNAMIE

TOXICOLOGIE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

IMMUNOLOGIE

PHYSIOLOGIE

PHYSIQUE-INFORMATIQUE

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE

BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
PHARMACEUTIQUE

PHARMACOTECHNIE

INFORMATIQUE

ASSISTANTS

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Claude

ANGLAIS

ATER :

A mes parents,

*pour votre amour, votre présence et votre soutien tout au long
de mes études, soyez assurés de ma plus tendre affection*

A mon frère,

A mes amis.

Je tiens tout particulièrement à remercier :

Madame le Docteur Annick ROUSSEAU, votre expérience et vos nombreux conseils m'ont été d'une aide précieuse pour l'accomplissement de ce travail, un énorme merci pour vos encouragements, votre patience, votre disponibilité et pour le temps passé à la relecture de cette thèse, soyez assurée de toute ma gratitude,

Monsieur le Professeur Pierre MARQUET, vous m'avez confié le sujet de cette thèse, vous avez orienté mon travail, vous m'avez fait bénéficier de vos compétences par vos précieux conseils, merci pour votre confiance et votre soutien, je vous en suis profondément reconnaissante,

Monsieur le Professeur Gérard LACHATRE, en m'accueillant au sein du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges vous m'avez permis de mener à bien l'ensemble de mes travaux et je suis sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider cette thèse,

Monsieur le Docteur Michel LAURENTIE, qui a permis la réalisation des expérimentations animales, pour son accueil à l'agence de l'A.F.S.S.A. de Fougères, pour sa sympathie et pour sa collaboration.

Je veux également remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement des expérimentations animales : Mireille Canal, Jean-Michel Gaulier, Pierre Marquet, Gaël Merle, Caroline Monchaud, Sylvie Ragot, Marie-Laure Reynaud, Annick Rousseau ainsi que le personnel de l'A.F.S.S.A. Fougères.

Enfin je remercie les membres du personnel du Service de Pharmacologie et Toxicologie pour leur accueil chaleureux et plus particulièrement Jean-Louis Dupuy, Jean-Michel Gaulier, Laure Larcher et Jean-Paul Valette pour le temps qu'ils m'ont consacré et la patience dont ils ont fait preuve à mon égard.

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION</i>	9
<i>I. GENERALITES SUR LA CHRONOBIOLOGIE</i>	11
I.1. Les rythmes biologiques et leur caractérisation	11
I.2. Chronopharmacologie	12
I.2.1. Chronergie	13
I.2.2. Chronesthésie	13
I.2.3. Chronopharmacocinétique	13
<i>II. MATERIEL ET METHODE : CONDITIONS GENERALES</i>	19
II.1. Animaux et conditions expérimentales	19
II.2. Dosage du cortisol	20
II.3. Traitement	20
II.3.1. Schéma d'administration	20
II.3.2. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques	21
II.3.3. Calcul des doses à administrer	21
II.3.4. Protocole d'administration	22
II.4. Prélèvements sanguins	23
II.5. Contrôles de qualité réalisés lors de l'expérimentation	23
II.6. Méthodes analytiques pour le dosage des médicaments anticancéreux	24
II.7. Analyse statistique et pharmacocinétique	25
II.7.1. Traitement des données de la test-dose	25
II.7.2. Analyse statistique	25
II.7.3. Etude des fluctuations périodiques	26
<i>III. LE CORTISOL</i>	28
III.1. Analyse des fluctuations périodiques	28
III.2. Discussion	28
<i>IV. LA VINORELBINE</i>	30
IV.1. Schéma d'administration	30
IV.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques	30
IV.1.2. Dose administrée	30
IV.2. Réalisation pratique de l'expérimentation	30
IV.3. Résultats	31
IV.3.1. Analyse graphique	31
IV.3.2. Analyse statistique	32
IV.3.3. Analyse des fluctuations périodiques	34
IV.4. Discussion	34

<i>V. LE METHOTREXATE</i>	36
V.1. Schéma d'administration et conditions particulières	36
V.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques	36
V.1.2. Dose administrée	36
V.1.3. Protocole particulier d'administration	37
V.2. Réalisation pratique de l'expérimentation	38
V.3. Résultats	39
V.3.1. Analyse graphique	39
V.3.2. Analyse statistique	41
V.3.3. Etude des fluctuations périodiques	41
V. 4. Discussion	44
<i>VI. LE 5-FLUOROURACILE (5-FU)</i>	45
VI.1. Schéma d'administration et conditions particulières	45
VI.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques	45
VI.1.2. Dose administrée	45
VI.2. Réalisation pratique de l'expérimentation	46
VI.3. Résultats	46
VI.3.1. Analyse graphique	47
VI.3.2. Analyse statistique	49
VI.3.3. Etude des fluctuations périodiques	49
VI.4. Discussion	51
<i>VII. LA DOXORUBICINE</i>	53
VII.1. Schéma d'administration et conditions particulières	53
VII.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques	53
VII.1.2. Dose administrée	53
VII.2. Réalisation pratique de l'expérimentation	54
VII.3. Résultats	54
VII.3.1. Analyse graphique	54
VII.3.2. Analyse statistique	56
VII.3.3. Etude des fluctuations périodiques	56
VII.4. Discussion	57
<i>VIII. CONCLUSION</i>	58
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	61

INTRODUCTION

L'efficacité d'un traitement anticancéreux peut parfois être améliorée en adaptant le schéma d'administration de chimiothérapie de façon à réduire la toxicité et à pouvoir accroître l'intensité de dose. Une telle optimisation des thérapeutiques existantes peut faire appel à l'adaptation individuelle de posologie basée sur la mesure des concentrations sanguines, mais aussi à l'adaptation de la chimiothérapie aux rythmes circadiens auxquels pourraient éventuellement être soumis les médicaments utilisés (chronothérapie).

En effet, l'existence de rythmes biologiques peut induire des variations de l'effet et de la toxicité des médicaments anticancéreux en fonction de l'horaire d'administration, qu'il s'agisse d'administrations ponctuelles ou d'administrations continues. Des travaux ont consisté à rechercher l'origine de ce phénomène chronopharmacologique et un intérêt particulier s'est porté sur l'étude de la chronocinétique des médicaments qui pourrait, en partie, expliquer ces fluctuations périodiques.

L'étude des variations circadiennes de la pharmacocinétique d'un médicament ne peut être réalisée que *in vivo* chez l'homme ou chez l'animal et elle s'appuie sur deux concepts méthodologiques principaux : administrations uniques du médicament à différentes heures dans l'échelle des 24 heures (4 à 6 horaires d'administration différents) et recherche de variations périodiques des concentrations observées et des paramètres pharmacocinétiques déterminés ; ou administration du médicament en perfusion continue à débit constant sur une durée de 24 heures minimum en réalisant des prélèvements régulièrement répartis dans le temps de façon à suivre l'évolution temporelle des concentrations. Cette seconde solution requiert moins de sujets d'expérience.

Selon le plan d'expérience envisagé et la dose de médicament administrée, il est parfois nécessaire d'avoir recours à un modèle animal. Dans ce cas, le recours à un gros

animal, d'activité diurne avec des caractéristiques pharmacocinétiques proches de celles de l'homme paraît préférable à l'utilisation de petits rongeurs nocturnes.

Le premier objectif de cette étude était de mettre au point un modèle animal se rapprochant le plus possible de l'homme pour la recherche de variations chronobiologiques de la pharmacocinétique de médicaments anticancéreux.

Le deuxième objectif était l'utilisation de ce modèle pour mettre en évidence un éventuel effet chronopharmacocinétique de médicaments anticancéreux : le 5-fluorouracile (pour lequel l'existence d'un tel effet chez l'homme est fortement suspectée), la vinorelbine, le méthotrexate et la doxorubicine.

I. GENERALITES SUR LA CHRONOBIOLOGIE

I.1. Les rythmes biologiques et leur caractérisation

La rythmicité constitue une propriété fondamentale de la matière vivante à tous les niveaux d'organisation, du niveau moléculaire jusqu'à l'individu tout entier. En effet, la plupart des processus biochimiques, biophysiques, pharmacologiques, psychologiques,... présentent une variation périodique (circadienne, mensuelle, circannuelle,...) et prévisible dans le temps (Reinberg & Smolensky, 1982).

Les rythmes biologiques sont quantifiables par des méthodes de modélisation mathématiques spécifiques. Le modèle mathématique le plus fréquemment employé est la fonction du cosinor. L'analyse consiste à trouver, par approximations successives, la fonction sinusoïdale qui décrit le mieux les mesures temporelles expérimentales. Cette fonction sinusoïdale est de la forme : $y = \text{mesor} + \text{amplitude} \times \cos[(x - \text{acrophase}) \times 2\pi / \text{période}]$.

Cette modélisation permet la description et la quantification d'un rythme biologique en utilisant 4 paramètres :

- le niveau moyen ou Mesor (M) : niveau ajusté du rythme pour la période considérée (il est égal à la moyenne arithmétique des valeurs mesurées lorsque les mesures sont faites à intervalles égaux),
- l'amplitude (A) : moitié de la variabilité totale du rythme pour la période considérée (elle correspond aux variations de la fonction de part et d'autre du niveau moyen),
- l'acrophase (\emptyset) : localisation du sommet de la variation dans l'échelle des temps, pour la période considérée et par rapport à une phase de référence (elle représente le sommet de la fonction sinusoïdale qui sert à l'approximation du rythme),

- la période (τ) : intervalle de temps mesuré entre deux épisodes qui vont se reproduire, identiques à eux-même, au cours de la variation.

Classiquement, les rythmes biologiques sont classés en 3 grands groupes. On distingue les rythmes circadiens dont la période est d'environ 24 h, les rythmes ultradiens caractérisés par une période inférieure à 24 h et les rythmes infradiens dont la période est supérieure à 24 h. Les périodes de ces rythmes sont calibrées par des facteurs environnementaux appelés synchroniseurs.

La chronobiologie étudie la structure temporelle des organismes, ses altérations et les mécanismes qui en assurent le contrôle et le maintien.

Les rythmes biologiques peuvent, entre autre, influencer la réponse d'un organisme à un médicament et la chronopharmacologie étudie le devenir et les effets des médicaments dans l'organisme en fonction du temps (c'est-à-dire en fonction du moment de leur administration).

I.2. Chronopharmacologie

La mise en évidence de modifications périodiques de l'action d'un médicament et leur implication thérapeutique peut permettre d'améliorer l'efficacité et/ou la tolérance des médicaments (Lemmer B., 1995).

Trois concepts doivent être pris en compte pour étudier les variations périodiques de l'activité des médicaments (Reinberg A.E. et col., 1991): la chronergie, la chronesthésie et la chronopharmacocinétique.

I.2.1. Chronergie

Elle désigne les variations rythmiques des effets des médicaments sur l'organisme. Elle inclut les variations des effets recherchés (chronoefficacité), des effets non désirés (chronotoxicité) et de la résistance d'un organisme aux effets toxiques (chronotolérance).

I.2.2. Chronesthésie

La chronesthésie correspond aux variations rythmiques de la sensibilité d'un système cible (cellules, récepteurs, tissus, organes, etc.) à un médicament.

I.2.3. Chronopharmacocinétique

La chronopharmacocinétique (ou chronocinétique) correspond aux variations prévisibles dans le temps des paramètres utilisés pour caractériser la pharmacocinétique d'un médicament tels que la concentration plasmatique maximale, l'aire sous la courbe (ou AUC) de la concentration en fonction du temps, le volume de distribution, la clairance, les demi-vies, etc. Chaque étape pharmacocinétique d'un médicament (absorption, distribution, métabolisme et élimination) peut présenter un rythme. Ces différentes phases sont influencées par diverses fonctions physiologiques (débit sanguin hépatique, activités enzymatiques, concentration des protéines plasmatiques, filtration glomérulaire,...) qui présentent elles-mêmes des variations circadiennes (Bruguerolle B., 1998).

La chronocinétique des médicaments a été largement considérée pour déterminer l'influence de l'heure de l'administration des médicaments et pour étudier son implication dans les variations périodiques de leurs effets (Bruguerolle B., 1998). Des variations pharmacocinétiques sur 24 heures ont été montrées pour des médicaments cardiovasculaires (propranolol, nifédipine, vérapamil,...), antiasthmatiques (théophylline, terbutaline), anti-

inflammatoires non stéroïdiens, psychotropes, analgésiques, antibiotiques et suspectées pour certains médicaments anticancéreux (Lemmer & Bruguerolle, 1994).

C'est l'aspect chronocinétique qui est considéré dans la présente étude.

I.2.3.1. Intérêts de la chronocinétique en cancérologie

L'augmentation de la fréquence des traitements anticancéreux et l'utilisation de doses plus élevées pourraient contribuer à améliorer l'efficacité antitumorale et à réduire la probabilité de développement de cellules chimiorésistantes. Mais un des principaux facteurs limitant de la chimiothérapie est la tolérance du patient.

Une des stratégies des traitements anticancéreux, consiste à utiliser le rythme circadien de sensibilité de l'hôte malade (chronotolérance) de façon à optimiser le ou les horaires d'administration du médicament (maximum de la dose à l'heure où le médicament est le mieux toléré et minimum de la dose à l'heure où il l'est le moins bien). Différents essais menés par l'équipe de Lévi (1999) ont suggéré la contribution de la chronomodulation de quelques traitements anticancéreux (comme le 5-fluorouracile, l'oxaliplatine) à l'augmentation de réponses objectives.

Les mécanismes de la chronotolérance font notamment intervenir la chronocinétique du médicament et sa chronotoxicité. Ainsi une étude approfondie de ces phénomènes semble être indispensable à la mise au point de schémas d'administrations chronomodulées.

I.2.3.2. Etat des connaissances sur la chronocinétique des molécules étudiées

- **La vinorelbine (VNB)**

Un effet chronopharmacologique de la VNB, se caractérisant par une toxicité moindre et donc par une meilleure tolérance lorsqu'elle est administrée en fin de période nocturne, a été mis en évidence chez la souris (Tampellini M. et col., 1995 ; Filipski E. et col., 1999), mais ces deux études n'ont pas pris en compte la pharmacocinétique de la molécule.

- **Le méthotrexate (MTX)**

Les valeurs de concentrations plasmatiques de méthotrexate constituent un facteur important de la prédiction de la réponse pharmacologique car elles sont corrélées à la toxicité de cette molécule (Stoller R.G. et col., 1977).

L'existence d'un rythme circadien des concentrations plasmatiques, pouvant en partie s'expliquer par un rythme circadien de la fonction rénale, a été démontrée chez des souris ayant reçu une injection unique de MTX (400 mg/kg) à 6 horaires différents de la journée. Les concentrations maximales étaient observées lorsque le MTX était administré à 9h00 et à 13h00 et minimales lorsqu'il était administré à 17h00 et à 21h00 (Ohdo S. et col., 1997).

Chez 6 enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) recevant leur traitement quotidien de MTX, dose moyenne unique (entre 36 et 80 mg/m²) injectée en bolus de 3 minutes à 2 horaires différents de la journée (10h00 et 21h00), il a été montré que la clairance plasmatique du MTX diminuait significativement ($p < 0,05$) en période nocturne (Koren G. et col., 1992) ce qui se traduisait par une exposition systémique plus importante.

En revanche, une étude de la pharmacocinétique du MTX administré en perfusion de 30 minutes (400 mg/m²) à 6h00 et 18h00 chez 6 patients avec un lymphome n'a pas mis en

évidence de différence significative entre les 2 horaires d'administration (Robinson B.A. et col., 1989).

Il semble donc intéressant, dans le cas du MTX également, de vérifier l'existence d'un rythme, circadien ou de toute autre période, capable d'influencer la pharmacocinétique de ce produit et de préciser les horaires correspondant au maximum et au minimum de concentration, grâce à un modèle d'administration par perfusion continue.

- **Le 5-fluorouracile (5-FU)**

Trois études rapportent l'existence d'un rythme circadien des concentrations plasmatiques de 5-FU administré en perfusion intraveineuse continue à débit constant. La première, réalisée chez 7 patients souffrant d'un carcinome de la vessie au stade C recevant une perfusion de 5-FU (450 à 966 mg/m²/jour) pendant 5 jours, a mis en évidence un rythme significatif des concentrations plasmatiques ($p < 0,0001$) avec un pic situé à 1h00 et un creux vers 10h00 (Petit E. et col., 1988).

La seconde, menée sur une période de 2 jours chez 7 patients atteints d'un cancer gastrointestinal recevant une perfusion veineuse de 5-FU (300 mg/m²/jour), a mis en évidence un rythme significatif ($p < 0,00001$) avec un pic de concentration à 11h00 et un creux à 23h00 (Harris B.E. et col., 1990). L'étude simultanée de l'activité enzymatique de la dihydropyrimidine deshydrogénase (enzyme limitante du catabolisme du 5-FU) dans les cellules sanguines périphériques a également montré l'existence d'un rythme significatif avec une relation inverse entre les 2 paramètres : un pic d'activité à 1h00 et un creux à 13h00. Il semble toutefois étonnant que la diminution de concentration plasmatique précède l'augmentation de l'activité enzymatique.

La troisième étude, menée par Metzger et col. (1994) décrivait un schéma d'administration en perfusion continue à débit constant chez 4 patients souffrant d'un cancer

colorectal métastatique recevant pendant 5 jours du 5-FU (600 mg/m²/jour), de l'acide folinique (300mg/m²/jour) et de l'oxaliplatine (20 mg/m²/jour). Elle rapporte l'existence de variations rythmiques des concentrations de 5-FU (p<0,01) avec un pic à 4h00 et un creux à 13h00.

L'interprétation des résultats de ces trois études est donc difficile, puisque deux d'entre elles retrouvent un pic de concentration entre 1h00 et 4h00 du matin et une seule autre, mais avec des mesures concordantes d'activité enzymatique, un pic à 11h00, c'est-à-dire pratiquement en opposition de phase.

L'intérêt d'étudier la chronocinétique de ce médicament est lié à l'existence d'une corrélation entre les concentrations plasmatiques de 5-FU d'une part, sa toxicité (sévère pour des concentrations supérieures à 3000 µg/L) et son efficacité d'autre part, relation clairement montrée par Gamelin E.C. et col. (1996). De plus, ce médicament est probablement l'agent anticancéreux qui fait le plus l'objet de chronothérapie. Ainsi, une administration continue chronomodulée avec un débit maximum à 4h00 du matin (Lévi F. et col., 1999) délivré à l'aide de pompes de perfusion programmables est adoptée dans de nombreux centres français et européens. Il semble donc utile de tenter de lever l'ambiguïté concernant la pharmacocinétique de ce médicament en réalisant une nouvelle étude, mais cette fois sur un modèle animal, c'est-à-dire dans des conditions parfaitement contrôlées et standardisées, ce qui est rarement possible pour des périodes aussi longues chez l'homme, malade de surcroît.

- **La doxorubicine**

Des études réalisées chez des patients atteints de cancer ont montré que la toxicité de la doxorubicine pouvait être influencée par l'heure de son administration. En effet, lorsqu'elle est administrée en fin de période de repos ou en début de période d'activité (horaire défini comme optimal) la tolérance serait meilleure et la toxicité diminuée (Hrushesky WJ., 1985).

Il a été rapporté que, chez 18 patientes souffrant d'un cancer du sein et ayant reçu de la doxorubicine (50 mg/m² en bolus I.V.) à 2 horaires différents (9h00 ou 21h00), la clairance totale du médicament diminuait significativement lorsque le médicament était administré à 21h00 (Canal P. et col., 1991). Il en résultait une augmentation de l'AUC et de la demi-vie d'élimination.

La chronocinétique de la doxorubicine administrée en perfusion continue pendant 4 jours (15 à 20 mg/m²/j), a été étudiée chez 9 patientes atteintes d'un cancer du sein. Les concentrations les plus faibles étaient observées en fin de nuit. Des concentrations plus élevées étaient obtenues entre midi et 2h00 du matin, horaires où la toxicité hématologique était relativement importante. Une influence de ces variations de la concentration plasmatique sur la réponse thérapeutique et la toxicité a alors été suggérée (Sqalli A. et col. 1988). En effet, chez des patients (n = 32) avec un cancer avancé recevant une perfusion longue continue (0,2 à 6,1 mg/m²/j) de doxorubicine pendant 2 à 50 semaines, Ackland et col. (1989) ont montré que le nadir du taux de leucocytes était corrélé à la concentration de doxorubicine.

II. MATERIEL ET METHODE : CONDITIONS GENERALES

II.1. Animaux et conditions expérimentales

Le modèle animal utilisé était le porc femelle de race Landrace X Large White Piétrain âgé de 3 à 4 mois (provenant de l'INRA, station de recherche porcine Saint Gilles, France) et de poids compris entre 25 et 40 kg correspondant à une surface corporelle estimée de 0,8 à 1 m².

Chaque expérimentation a été réalisée sur un lot de 4 porcs sains.

Une semaine avant le début de l'expérimentation deux cathéters (un destiné à l'administration du médicament et l'autre aux prélèvements sanguins) étaient implantés chez chaque porc par voie chirurgicale dans les veines jugulaires externes (un dans chaque veine). Ces cathéters ont été tunnélisés pour sortir au niveau du dos de l'animal afin de faciliter les prélèvements multiples qui devaient être réalisés lors de l'expérimentation.

Deux semaines avant l'expérimentation et durant toute la durée de celle-ci, les animaux étaient maintenus dans l'animalerie dans un environnement standardisé. Ils étaient synchronisés avec exposition à la lumière de 8h00 à 20h00 et à l'obscurité de 20h00 à 8h00. Les animaux étaient placés dans des cages à métabolisme individuelles. La même quantité de nourriture leur était délivrée deux fois par jour et ils disposaient d'eau à volonté. La température de l'animalerie était maintenue à 21°C et les débits d'air circulant étaient parfaitement contrôlés.

Pour bénéficier d'un tel environnement et de conditions expérimentales optimales, les expérimentations ont été effectuées dans une animalerie de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (A.F.S.S.A.) à Fougères en collaboration avec le Docteur Michel Laurentie, Directeur de l'Unité Pharmacocinétique.

II.2. Dosage du cortisol

Le cortisol est une des principales hormones glucocorticoïdes. Elle est indispensable à la vie car elle intervient dans de nombreux mécanismes physiologiques.

Chez l'homme, la sécrétion du cortisol par le cortex surrénal est un phénomène soumis à l'influence des rythmes biologiques et varie de façon nyctémérale (Weitzman E.D. et col., 1971). Ce phénomène a été précédemment rapporté chez l'animal et notamment chez le porc (Klemcke H.G. et col., 1989).

L'existence d'un tel rythme a été recherchée chez les animaux servant à l'étude. Pour cela, le taux de cortisol a été mesuré dans les échantillons sanguins recueillis lors d'une des expérimentations (prélèvement d'un échantillon toutes les heures pendant 48 heures, chez 4 porcs).

Le cortisol a été dosé au Laboratoire de Biochimie, Pharmacotoxicologie et Analyse des Traces de l'Hôpital Edouard Hériot de Lyon. La détermination quantitative du cortisol sérique utilise les Systèmes Automatiques en Chimiluminescence ACS :180[®] de Chiron Diagnostics. Il s'agit d'un immunodosage par compétition, utilisant une technologie chimiluminescente directe. Cette méthode permet de mesurer des concentrations de cortisol sérique avec une limite de quantification de 5,5 nmol/L.

II.3. Traitement

II.3.1. Schéma d'administration

Chaque substance anticancéreuse étudiée était administrée en perfusion longue intraveineuse continue à débit constant pendant 60 heures. Pour les médicaments à demi-vie d'élimination longue, une dose de charge était administrée en début de traitement afin d'obtenir une concentration stable dès les premières heures de la perfusion.

Les doses administrées ont été calculées en fonction de la concentration à l'état stationnaire ciblée en thérapeutique lors d'une perfusion continue de la substance considérée chez l'homme (lorsqu'une valeur d'exposition cible était connue).

Des valeurs d'exposition optimum ont été établies pour le MTX, utilisé en perfusion de 24 heures dans le traitement de certaines LLA de l'enfant (Evans W.E., 1998) et pour le 5-FU, administré en perfusion de 5 jours dans les cancers ORL (Féty R. et col., 1998).

Pour la vinorelbine et la doxorubicine, les doses ont été déterminées sur la base d'une intensité de dose ($\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$) utilisée dans des études rapportant l'utilisation de ces molécules en perfusion longue.

II.3.2. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques

Les paramètres pharmacocinétiques de chaque molécule ont été évalués chez le porc à partir de données bibliographiques concernant des études réalisées chez l'homme ou chez l'animal et/ou déterminés à partir d'une test-dose, réalisée au préalable chez un porc ne participant pas à l'expérimentation. Un bolus de médicament était administré par injection et suivi de 10 à 15 prélèvements sanguins programmés dans le temps de façon à obtenir une cinétique d'élimination. A partir des valeurs des concentrations obtenues, les différents paramètres de ces cinétiques dont la clairance totale (CL_T), le volume de distribution du compartiment central (V_1), et la ou les demi-vie(s) étaient calculés.

II.3.3. Calcul des doses à administrer

- **Dose de perfusion longue**

Les doses D (mg) de MTX et de 5-FU ont été calculées, à partir des valeurs des paramètres pharmacocinétiques déterminées par la test-dose, pour maintenir une concentration à l'état stationnaire (C_{ss} en mg/L) cible donnée.

Ainsi : $D = C_{ss} \times CL_T \times T$

$$D = AUC \times CL_T$$

Où CL_T ($L \cdot h^{-1}$) est la clairance plasmatique totale, T la durée totale de la perfusion (h) et AUC l'aire sous la courbe ($mg \cdot L^{-1} \cdot h$).

Pour la VNB et la doxorubicine, la pratique clinique courante consiste à administrer une intensité de dose standard identique à tous les patients (sans cibler une valeur d'exposition systémique). Aussi la dose de perfusion continue de VNB et de doxorubicine a-t-elle été choisie à partir de données bibliographiques. La concentration théorique atteinte à l'état stationnaire était alors calculée selon la formule :

$$C_{ss} = \frac{\text{Débit de perfusion}}{CL_T}$$

- **Dose de charge**

C'est la dose D_0 (mg) qui, injectée par voie I.V. rapide donne une concentration pic égale à C_{ss} ($mg \cdot L^{-1}$)

Ainsi : $D_0 = V_1 \times C_{ss}$ où V_1 est le volume du compartiment central (L), calculé à partir de la test-dose.

II.3.4. Protocole d'administration

La dose de charge, lorsqu'elle était nécessaire, était administrée en bolus grâce au cathéter destiné à l'administration du médicament. La perfusion continue succédait immédiatement au bolus et était assurée par un pousse-seringue électrique à débit programmable. Les seringues de 50 mL contenant les solutions médicamenteuses étaient renouvelées toutes les 4 heures et le changement était rapidement effectué juste après un

prélèvement sanguin de façon à limiter une éventuelle modification des concentrations sanguines causée par cette manipulation.

II.4. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins (environ 5 mL) étaient réalisés sur tubes secs toutes les heures pendant toute la durée de la perfusion (soit 60 heures) au moyen du deuxième cathéter. Ils étaient immédiatement centrifugés (10 minutes, 3000g) et les échantillons sériques obtenus après décantation étaient aliquotés, congelés à -20°C (-80°C pour la VNB) et conservés jusqu'à leur dosage ultérieur.

Pendant la période d'obscurité, les prélèvements étaient effectués à la lumière de lampes rouges, délivrant moins de 20 lux au niveau de la tête de l'animal, contre 500 lux minimum en période de clarté (lumière artificielle régulée).

II.5. Contrôles de qualité réalisés lors de l'expérimentation

Les conditions de stabilité propres à chaque médicament ont été rigoureusement respectées (température de stockage, photosensibilité, durée de conservation des solutions diluées, etc...) (Husson & Becker, 1995).

Tout au long de l'expérimentation, les débits de perfusion ainsi que la concentration des solutions médicamenteuses administrées étaient contrôlés.

- une seringue de contrôle remplie d'eau teintée par du bleu de méthylène était placée sur chaque pompe de perfusion (pouvant contenir 2 seringues) permettant ainsi de vérifier le débit de perfusion par mesure, toutes les heures, du volume recueilli dans une éprouvette graduée

- lors de chaque changement de seringue de médicament (toutes les 4 heures), la quantité de solution médicamenteuse restant dans la seringue était recueillie et congelée afin d'être analysée ultérieurement lors du dosage des échantillons sériques.

II.6. Méthodes analytiques pour le dosage des médicaments anticancéreux

Tous les dosages sériques ont été effectués dans le service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Dupuytren de Limoges.

La vinorelbine a été dosée par une méthode utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Ragot S. et col., 2000), méthode dont la limite de quantification est de 0,5 ng/mL.

Le méthotrexate a été dosé par méthode d'immunopolarisation de fluorescence (FPIA) sur automate TDX (Abbott). La limite de quantification est de 0,05 $\mu\text{mol/L}$.

Le 5-FU a été dosé par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes. Cette méthode a été validée avant d'être retenue pour cette étude. Les rendements d'extraction obtenus étaient acceptables (supérieurs à 50%). La méthode s'est révélée linéaire de la limite de quantification (c'est-à-dire 100 $\mu\text{g/L}$) jusqu'à 6000 $\mu\text{g/L}$. La répétabilité et la reproductibilité étaient suffisantes (C.V.<10% sur toute la gamme).

La doxorubicine a été dosée par chromatographie liquide couplée à spectrométrie de masse (Lachâtre F. et col., 2000). La limite de quantification de cette méthode est de 2,5 ng/mL.

II.7. Analyse statistique et pharmacocinétique

II.7.1. Traitement des données de la test-dose

La détermination des paramètres pharmacocinétiques de chaque molécule chez le porc a été réalisée au moyen du logiciel NONMEM, Version 5 pour PC (University of California, San Francisco).

II.7.2. Analyse statistique

- **Etude inter-jour**

Elle consiste à vérifier que chez un même animal, les concentrations moyennes ne diffèrent pas d'un cycle de 24 heures à un autre. L'évolution des concentrations au cours du temps a été étudiée par comparaison de moyennes et par régression.

Les concentrations moyennes observées pendant les 2 premières périodes de 24h (c'est-à-dire T1 à T24 et T25 à T48) et pendant les 2 dernières périodes de 24h (c'est-à-dire T13 à T36 et T37 à T60) ont été comparées par un test de Wilcoxon.

L'analyse de régression peut permettre de mettre en évidence une évolution monotone des concentrations. En cas d'augmentation (ou de diminution) significative des concentrations pendant la durée de l'expérimentation, et ceci chez plusieurs porcs, une analyse des données centrées a également été réalisée. Les données centrées correspondent aux écarts relatifs entre les valeurs de concentrations observées et celles calculées à partir de la droite de régression.

- **Comparaison jour/nuit**

Elle consiste à comparer les concentrations moyennes entre les périodes nocturnes et les périodes diurnes et utilise le test t ou test de Mann et Whitney (si le test F montre une différence significative entre les variances des 2 groupes).

Ces tests statistiques ont été réalisés dans le logiciel Statview (Abacus concept, Berkeley, USA).

II.7.3. Etude des fluctuations périodiques

- **Méthode mathématique**

La recherche d'un rythme a été réalisée au moyen de programmes spécifiques développés par l'équipe de Björn Lemmer (Faculty of Clinical Medicine Mannheim, Heidelberg, Germany) : PHARMFIT (Mattes A. et col., 1991) et DQ-FIT (Witte K. et col., 1997).

Ces deux versions permettent une modélisation des données selon la fonction cosinor, fonction sinusoïdale de la forme : $y = \text{mesor} + \text{amplitude} \times \cos[(x - \text{acrophase}) \times 2\pi / \text{période}]$.

Le calcul mathématique est basé sur l'algorithme de Marquardt-Levenberg dans PHARMFIT et sur les séries de Fourier dans DQ-FIT.

La recherche d'un rythme s'effectue par un test d'amplitude (une amplitude significativement différente de zéro traduit l'existence d'un rythme) et l'intensité de la relation est exprimée par le paramètre "% rhythm" (équivalent à un $r^2 \times 100$) représentant la proportion de "variations" des données qui peut être expliquée par la fonction ajustée.

Un rythme est initialement recherché en prenant en compte une période de 24h puis les harmoniques 24/2, 24/3, 24/4, 24/5 et 24/6 h sont également recherchées.

Les valeurs des paramètres permettant de quantifier le rythme sont obtenues avec leur écart-type.

- **Données analysées**

La recherche d'un rythme sur les valeurs de concentrations observées pendant les 60h d'expérimentation a été effectuée d'une part en considérant les données brutes (concentrations sériques observées chez chaque animal) et d'autre part en étudiant les données centrées.

De plus, lorsque de nombreux pics de concentration étaient observés sur les chronogrammes des 4 animaux, la méthode de lissage par l'utilisation des moyennes mobiles a aussi été appliquée.

Pour chaque analyse, deux approches ont été retenues :

- une approche individuelle
- une approche groupée considérant les données regroupées de tous les animaux (les concentrations moyennes étaient alors pondérées par l'inverse de la variance de la moyenne des concentrations soit $1/SEM^2$).

III. LE CORTISOL

III.1. Analyse des fluctuations périodiques

L'analyse statistique a porté sur les données obtenues sur 48 heures ; deux cycles complets et consécutifs de 24 heures étaient ainsi étudiés.

L'étude groupée des données de concentration (pondérées par $1/SEM^2$) a mis en évidence l'existence d'un rythme circadien significatif ($p < 0,0001$) avec une acrophase située en début de matinée à 9h25 (tableau 1).

Tableau 1 : Variation circadienne des concentrations de cortisol

	Mesor \pm SD (nmol/L)	Amplitude \pm SD (nmol/L)	Acrophase	% rythme	p
P1-P2-P3-P4	17,1 \pm 0,7	10,9 \pm 0,8	9:25	53,21	0,0000

Les variations périodiques de la moyenne des concentrations sont représentées sur la figure 1.

III.2. Discussion

Le rythme circadien des concentrations sériques de cortisol mis en évidence ici est tout à fait comparable aux résultats précédemment rapportés tant chez l'homme que chez le porc. En effet, des variations circadiennes des concentrations plasmatiques (Klemcke H.G. et col., 1989) et salivaires (Ekkel E.D. et col., 1996) de cortisol étaient décrites chez le porc avec une acrophase située en fin de matinée vers 11h00. Chez l'homme la sécrétion est maximale en début de matinée vers 8h00 (Weitzman E.D. et col., 1971).

La convergence de ces résultats est un argument essentiel en faveur de la validation du modèle animal choisi.

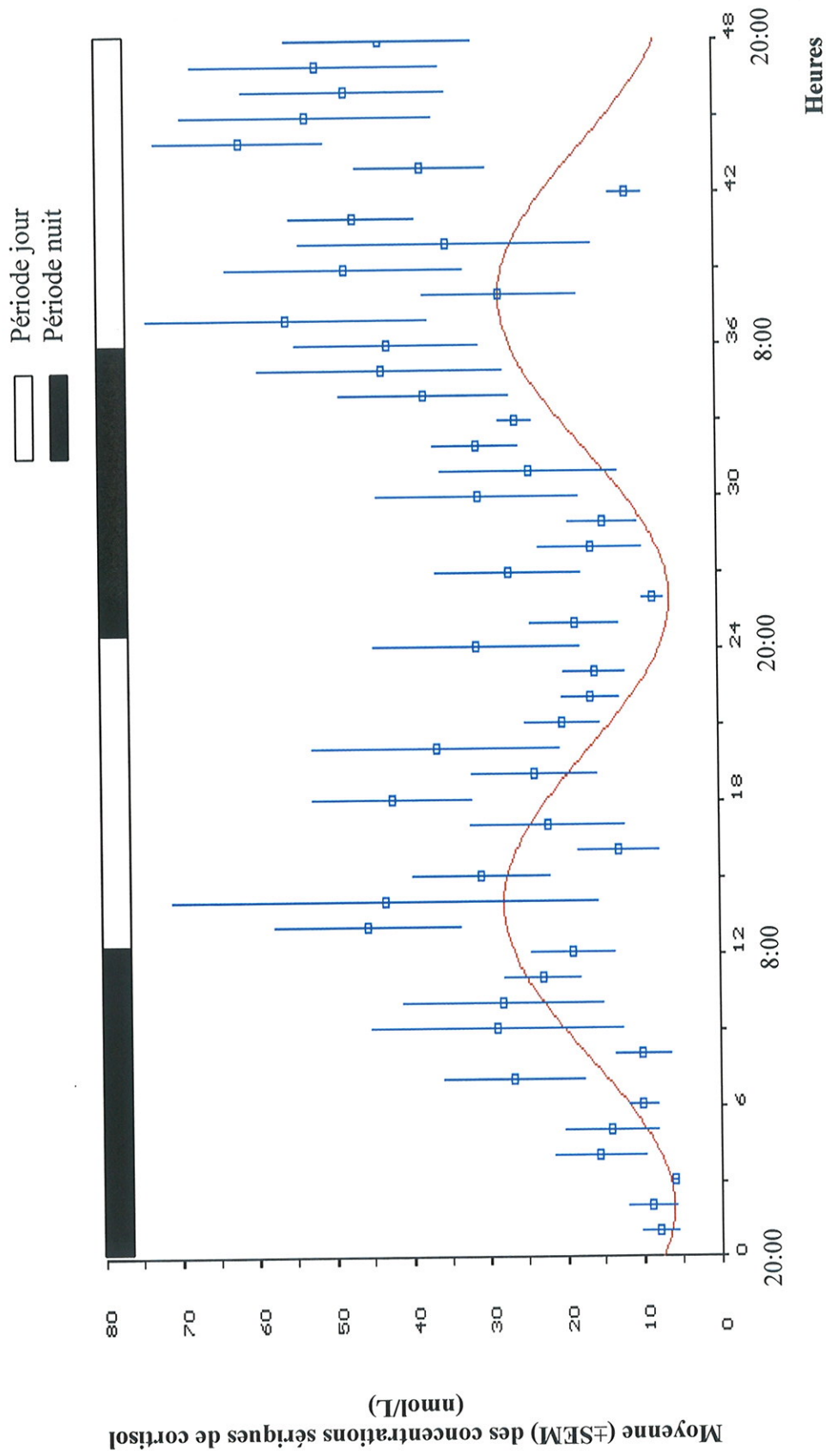


Figure 1 : Rythme circadien de la moyenne (± SEM) des concentrations sériques de cortisol observées chez les 4 porcs et fonction sinusoidale ajustée aux données par la méthode du cosinor

IV. LA VINOURELBINE

IV.1. Schéma d'administration

IV.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques

La valeur moyenne de la clairance totale chez le chien est estimée à 30 L/h et celle du volume du compartiment central à 10 L (Zhou X.J. et col., 1993).

La demi-vie de la vinorelbine comprise entre 26h et 48h chez l'homme a justifié l'administration d'une dose de charge pour atteindre plus rapidement la C_{ss}.

IV.1.2. Dose administrée

La dose de perfusion a été déterminée en s'appuyant sur une étude de phase II dans laquelle les patients recevaient la VNB en perfusion continue pendant 96 heures à la dose de 11 mg/m²/24 heures (Ibrahim N.K. et col., 1999) et la dose de charge a été calculée pour une C_{ss} attendue de 16 µg/L.

Ainsi, chaque animal (n = 4) de poids moyen 25 kg a reçu une dose de charge (en bolus) de 0,16 mg suivie d'une perfusion continue à la dose de 0,48 mg/h de vinorelbine (NAVELBINE[®], Pierre Fabre Oncologie, France).

IV.2. Réalisation pratique de l'expérimentation

Le contrôle de débit effectué sur chaque pompe à perfusion a permis de vérifier que la vinorelbine était administrée à débit constant.

Le dosage des reliquats de solution médicamenteuse recueillis lors des changements de seringue a montré une variabilité modérée des résultats (coefficient de variation = 9,8%). Ceci traduit l'homogénéité des concentrations de vinorelbine perfusées au cours du temps.

IV.3. Résultats

Avant toute interprétation des résultats, tous les pics de concentration ont été confirmés par une nouvelle série d'analyse.

IV.3.1. Analyse graphique

L'évolution des concentrations sériques de vinorelbine en fonction du temps est représentée pour chaque porc par des chronogrammes (figure 2).

Les concentrations moyennes sur 60h sont respectivement de $5,51 \pm 4,37$ ng/mL pour P1, $4,84 \pm 4,71$ ng/mL pour P2, $5,56 \pm 3,02$ ng/mL pour P3 et $2,28 \pm 0,60$ ng/mL pour P4. Ces valeurs se situent bien en dessous de la C_{ss} attendue (16 ng/mL) ce qui traduit une sous-estimation de la clairance utilisée dans le calcul des doses. Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques initialement choisies étaient celles rapportées chez le chien. Or, il est intéressant de remarquer que les valeurs observées chez le porc (cf. CL \approx 90 L/h) diffèrent des valeurs rapportées chez le chien mais elles sont similaires à celles observées chez l'homme (Levêque & Jehl, 1996).

La variabilité intra-animaux est relativement importante et se caractérise par des valeurs de concentration allant de 1,55 à 30,33 ng/mL (P1), de 0,5 à 33,46 ng/mL (P2), de

1,91 à 16,89 ng/mL (P3) et de 0,95 à 3,95 ng/mL (P4). La majorité des pics de concentration apparaissent la nuit.

Les valeurs des AUC (tableau 2) décrivent une exposition du médicament plus importante en période nocturne chez 3 des 4 animaux.

Tableau 2 : Valeurs des AUC pour chaque porc en ng.mL⁻¹.h

	AUC totale pour 60h	AUC jour (Moyenne sur 12h)	AUC nuit (Moyenne sur 12h)
P1	322,6	41,8	60,2
P2	287,1	60,8	111,6
P3	330,2	64,5	55
P4	134,6	28	31,6

IV.3.2. Analyse statistique

Chez chaque porc, l'étude inter-jour n'a pas mis en évidence de différences statistiquement significatives des concentrations moyennes par 24h.

Les concentrations moyennes observées le jour sont significativement supérieures aux concentrations moyennes observées la nuit chez P3 ($p < 0,02$). En revanche, chez P1, les concentrations nocturnes sont supérieures aux concentrations diurnes ($p < 0,05$). P2 présente seulement une tendance, non significative, dans le même sens. Chez P4 aucune différence significative n'a été mise en évidence (concentrations moyennes sensiblement égales).

Ces résultats peu homogènes d'un porc à l'autre ne permettent pas de décrire une tendance générale de l'évolution des concentrations sériques en fonction des cycles lumière/obscurité, activité/repos.

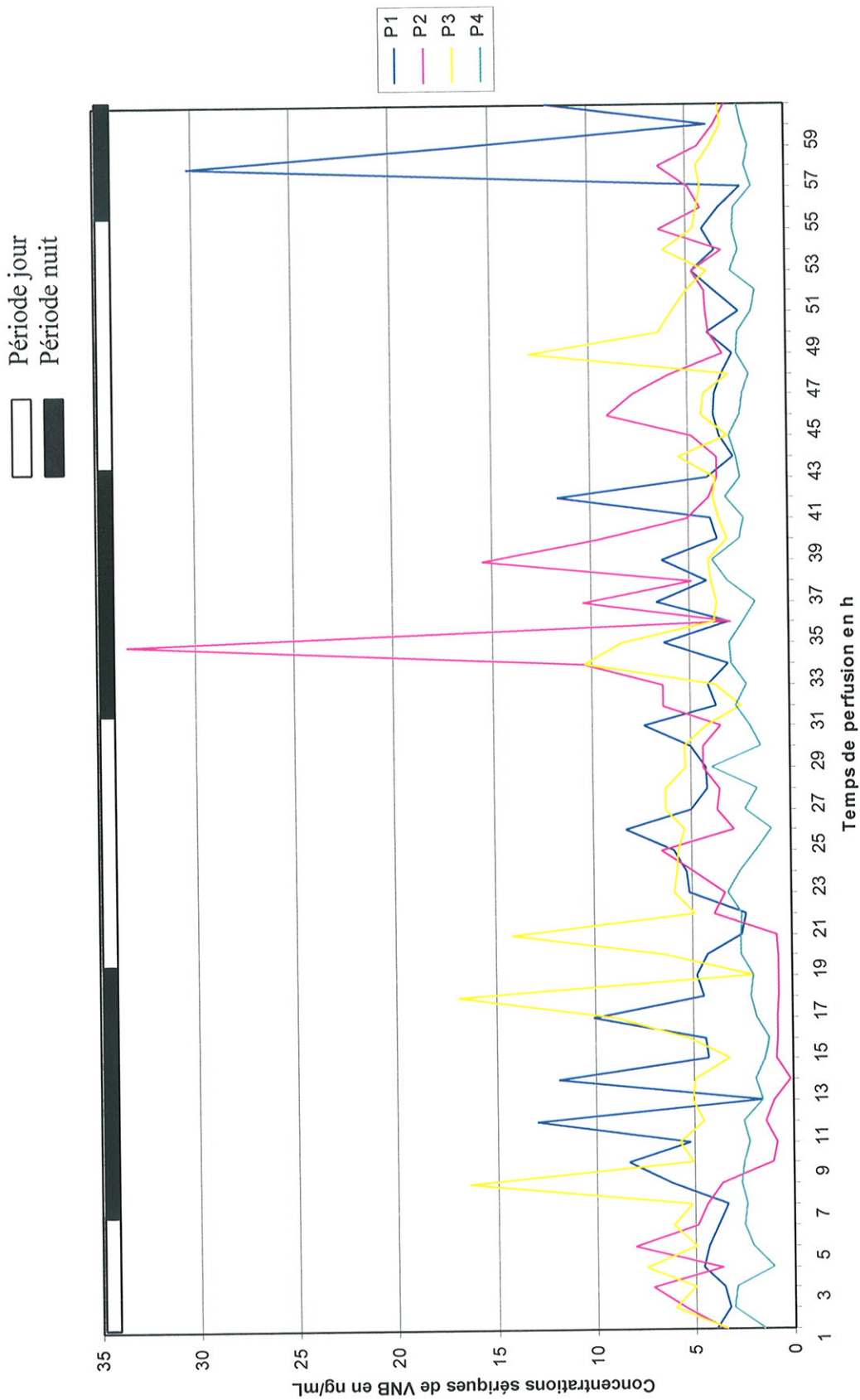


Figure 2 : Chronogrammes des concentrations sériques de la vinorelbine observés chez 4 porcs

IV.3.3 Analyse des fluctuations périodiques

L'analyse des données individuelles brutes par la méthode du cosinor n'a permis de détecter un rythme significatif des concentrations sur 24h que pour P1 ($p < 0,03$) avec un mesor de $5,4 \pm 0,5$ ng/mL, une amplitude de $2,1 \pm 0,8$ ng/mL et une acrophase située à environ 0h30. Aucun rythme n'a été détecté pour les 3 autres animaux.

Les concentrations de P1 et P2 présentant des profils d'évolution proches ont été étudiées ensemble et sont caractérisées par un rythme significatif (tableau 3).

Enfin, l'analyse des données groupées de l'ensemble des animaux met également en évidence l'existence d'un rythme circadien (tableau 3).

Tableau 3 : Variations circadiennes des concentrations sériques de vinorelbine ($\tau = 24h$)

	Mesor \pm SD (ng/mL)	Amplitude \pm SD (ng/mL)	Acrophase \pm SD	% rythme	p
P1	$5,4 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,8$	0:35 ($\pm 1h25'$)	11,73	0,0286
P1- P2	$4,5 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,05$	2:53 ($\pm 10'$)	60,9	0,0000
P1-P2-P3-P4	$3,7 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,1$	15:51 ($\pm 1h09'$)	23,24	0,0005

Toutefois, selon les données considérées, les résultats sont très différents. En effet, les acrophases ne sont pas observées lors des mêmes périodes.

IV.4. Discussion

Un rythme circadien statistiquement significatif des concentrations sériques de vinorelbine a pu être mis en évidence chez un seul porc, ou en considérant l'ensemble des concentrations chez les 4 porcs (données groupées). Toutefois les résultats obtenus sont contradictoires (en particulier, les acrophases ne sont pas observées lors des mêmes périodes) et ne sont pas en faveur de l'existence d'une réelle chronocinétique de la vinorelbine.

Un effet chronopharmacologique de la vinorelbine chez l'homme est actuellement suspecté et un protocole multicentrique visant à rechercher l'influence de l'horaire d'administration (par injections courtes) sur l'activité de ce médicament dans le traitement du cancer du sein est en cours. Bien sûr, l'absence d'un effet chronocinétique ne permet pas de préjuger de l'existence ou non d'un effet chronesthésique.

V. LE METHOTREXATE

V.1. Schéma d'administration et conditions particulières

V.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques

Une test-dose a été réalisée en administrant un bolus I.V. de 50 mg (faible dose des posologies usuelles en thérapeutique lors d'injection unique rapide et ne nécessitant pas de conditions particulières d'administration) à un porc de 40 kg et des prélèvements sanguins ont été effectués 5, 15, 30, 45, 60 minutes, 1, 3, 4, 5 et 6 heures après la fin de l'injection.

Le calcul des paramètres a été effectué sur la base d'un modèle pharmacocinétique bicompartimental. Les valeurs de clairance totale et du volume de distribution dans le compartiment central ont été estimées à 32 L/h et 9 L respectivement.

La demi-vie d'élimination du MTX étant comprise entre 3 et 10 heures à faible dose chez l'homme, et étant plus longue à dose moyenne et élevée, une dose de charge a été administrée.

V.1.2. Dose administrée

La dose de charge et le débit de perfusion ont été calculées à partir des paramètres pharmacocinétiques fournis par la test-dose, pour un porc de 40 kg, de façon à obtenir une concentration cible voisine de 20 μM (Evans W.E. et col., 1998).

Le poids des porcs à disposition pour l'expérimentation n'étant pas homogène, les doses administrées aux porcs de 25 kg (identifiés P1 et P2) correspondent aux 4/5^{ème} des doses administrées aux porcs de poids compris entre 35 et 40 kg (identifiés P3 et P4).

Les doses administrées correspondent à des posologies élevées ; elles sont rapportées dans le tableau suivant (tableau 4):

Tableau 4 : Doses de MTX administrées chez les porcs

Substance	Poids moyen des animaux en kg	Dose de charge en mg	Dose de perfusion en mg/h
METHOTREXATE TEVA® (Teva Pharma SA, France)	35-40 (n = 2)	82	272
	25 (n = 2)	65	218

V.1.3. Protocole particulier d'administration

Les conditions particulières classiquement adoptées en pratique clinique lors de l'administration de doses élevées de MTX ont été appliquées. Pendant les 2 heures qui précédaient l'administration du MTX, il a été procédé à une alcalinisation des urines avec solution de bicarbonate de sodium 1,4% administrée en I.V. Du début jusqu'à la fin de la perfusion de MTX, une hyperhydratation alcaline était réalisée afin d'éviter la précipitation du MTX en milieu acide dans les voies urinaires. La solution d'hydratation I.V. était constituée d'un mélange de bicarbonate de sodium 1,4% (1/3) et de solution glucosée à 5% avec 2g/L de KCl (2/3) (Odoul F. et col., 1999). De plus, de l'acide folinique, qui s'oppose aux effets toxiques des fortes doses du MTX, a été perfusé pendant toute la durée de l'expérimentation via la solution d'hydratation (tableau 5). Le pH urinaire a été contrôlé régulièrement (au moins toutes les 6 heures) et s'il était inférieur à 7, une solution de bicarbonate de sodium 1,4% était administrée par voie I.V.

Ce protocole a nécessité la mise en place d'un dispositif d'administration particulier comprenant un perfuseur relié au cathéter de perfusion en plus de la seringue de 50 mL actionnée par le pousse-seringue électrique.

Tableau 5 : Traitement administré

	Poids moyen des porcs soumis à l'expérimentation	
	25 kg	35 – 40 kg
Solution d'alcalinisation des urines en mL	250	350
Solution d'hydratation en mL/24h	1700	2100
Acide folinique en mg/24h (ELVORINE® Wyeth-Lederlé, France)	40	50

V.2. Réalisation pratique de l'expérimentation

Les solutions de MTX ont été perfusées à un débit constant au cours des 60h soit 12,5 mL/h.

L'homogénéité des concentrations de méthotrexate perfusées au cours du temps est traduite par la variabilité modérée (coefficient de variation <5%) des concentrations mesurées dans les reliquats de solution médicamenteuse recueillis lors des changements de seringues.

Certains problèmes particuliers ont été rencontrés :

- chez le porc P3, un incident au niveau de la perfusion a induit l'interruption de la perfusion du méthotrexate pendant 4 h (T8 à T12)
- dès la 21^{ème} heure d'expérimentation, le porc P4 a présenté des signes de toxicité se manifestant par une diarrhée intense. De plus, la valeur du pH urinaire relevée à T22 (inférieure à 7) a nécessité une administration d'un bolus de solution de bicarbonate. Enfin, des signes sévères de toxicité ont été observés à partir T49 : vomissements, hyperventilation, tremblements, attitude prostrée de l'animal, et pH plasmatique supérieur à 7,9. La perfusion de bicarbonate a alors été interrompue et remplacée par une solution glucosée afin de maintenir l'hydratation.

V.3. Résultats

Avant toute interprétation des résultats, les pics de concentration importante ont été confirmés par une nouvelle série d'analyses.

V.3.1. Analyse graphique

L'évolution des concentrations sériques de MTX en fonction du temps est représentée sur la figure 3.

Le chronogramme de P4 se distingue nettement des 3 autres par ses valeurs élevées de la concentration moyenne sur 60h (égale à 99 μM , elle correspond à 5 fois la concentration cible de 20 μM) et de l'AUC (tableau 6). De plus, chez ce porc, les concentrations présentent une variabilité importante avec des valeurs allant de 39,1 à 220 μM .

En ce qui concerne les 3 autres porcs (P1, P2 et P3), les concentrations moyennes sur 60 h, respectivement égales à $27,1 \pm 5,47 \mu\text{M}$, $31,9 \pm 6,3 \mu\text{M}$ et $30,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$, sont voisines de la concentration cible. La variabilité des concentrations est moins grande et semblable d'un porc à l'autre. Elles sont comprises entre 19,61 et 45,3 μM pour P1, 22,45 et 45,9 μM pour P2 et 23,09 et 43,43 μM pour P3 (au maximum, il existe un facteur 2,5 entre la concentration minimale et maximale). Les clairances totales calculées (de 15 à 19,5 L/h) à partir de ces concentrations moyennes (correspondant aux C_{ss}) sont du même ordre de grandeur que celles couramment observées chez l'homme (Sabot C. et col., 1993).

Une exposition plus importante la nuit chez ces 3 porcs est suggérée par la valeur des AUC (tableau 6).

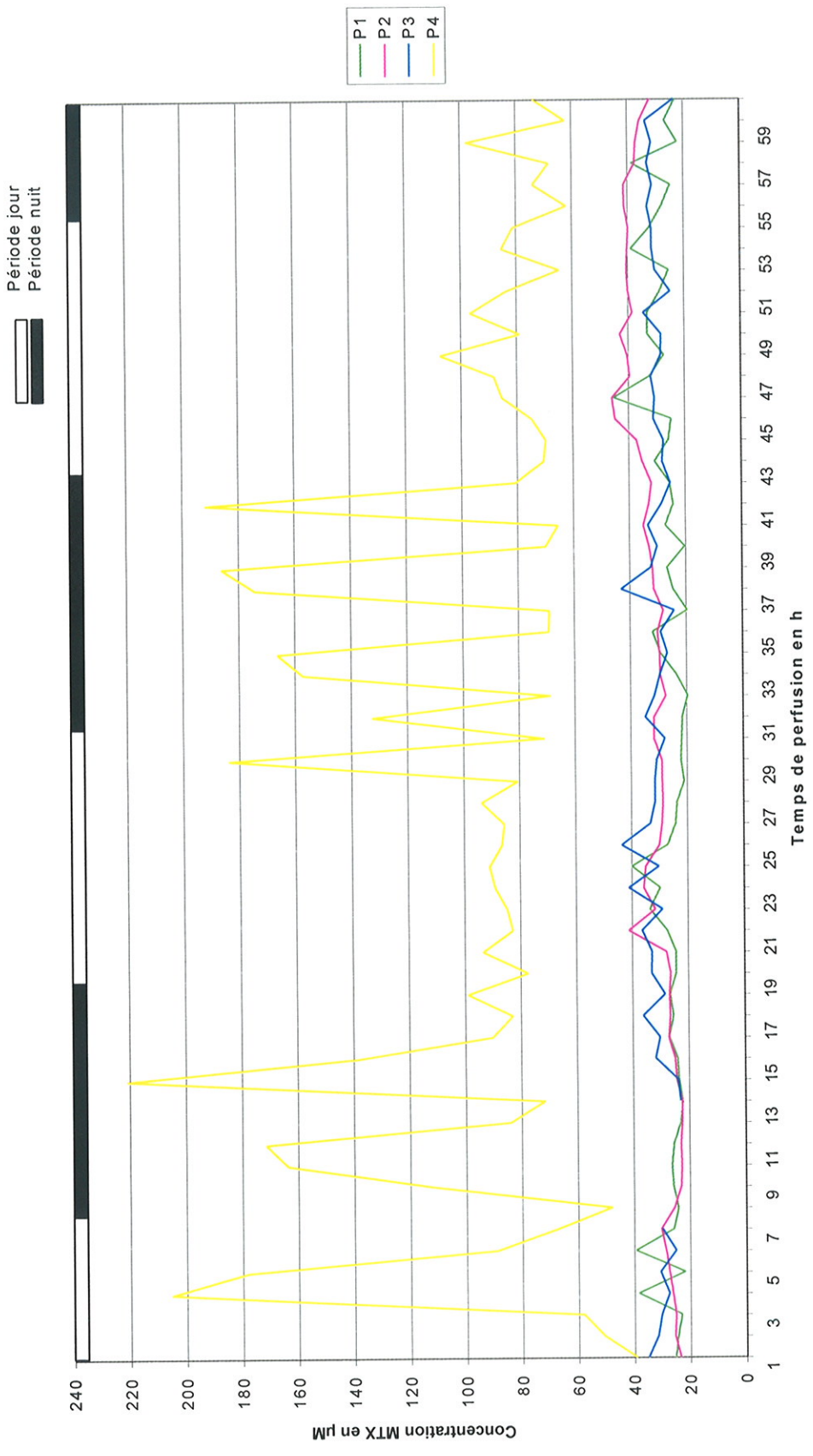


Figure 3 : Chronogrammes des concentrations sériques de méthotrexate observés chez 4 porcs

Tableau 6 : Valeurs des AUC pour chaque porc en $\mu\text{M}\cdot\text{h}$

	AUC totale sur 60h	AUC Jour (Moyenne sur 12h)	AUC Nuit (Moyenne sur 12h)
P1	1495,2	376	303,8
P2	1886	490,1	337,5
P3	1804,4	364,7	363,3
P4	5886,8	979,4	1376,9

V.3.2. Analyse statistique

Chez 3 des 4 porcs (P1, P3 et P4), l'étude inter-jour n'a pas mis en évidence de différences statistiquement significatives des concentrations moyennes par 24h. En revanche, l'analyse de régression a mis en évidence une augmentation significative des concentrations moyennes chez le porc P2 ($p < 0,0001$).

Les concentrations moyennes observées le jour sont significativement supérieures aux concentrations observées la nuit chez les porc P1 ($p < 0,05$) et P2 ($p < 0,01$) et une tendance dans le même sens est également observée chez le porc P3. Une tendance inverse est notée chez le porc P4.

V.3.3. Etude des fluctuations périodiques

Pour l'étude des fluctuations périodiques, les concentrations correspondant aux 4 premières heures de perfusion n'ont pas été prises en compte pour travailler avec des concentrations à l'état d'équilibre "installé" et s'affranchir de l'éventuel biais causé par la mise en route de l'expérimentation (protocole relativement lourd).

L'analyse par la méthode du cosinor a été réalisée individuellement chez chaque animal et a permis de détecter un rythme significatif sur une période de 24h chez 2 animaux

sur 4 (P1 et P2) avec des acrophases situées en période diurne, entre 12h30 et 13h00 (tableau 7).

La même analyse a été effectuée à partir des données poolées (pondérées par $1/SEM^2$) de l'ensemble des animaux d'une part et de 3 des 4 porcs d'autre part (P1, P2 et P3). Cette dernière analyse excluait le porc P4 qui a présenté des signes de toxicité sévères probablement liés à des concentrations excessives. Un rythme circadien significatif a été mis en évidence dans les deux cas (tableau 7).

Tableau 7 : Variations circadiennes des concentrations sériques de MTX ($\tau = 24$ heures)

	Mesor \pm SD (μ M)	Amplitude \pm SD (μ M)	Acrophase \pm SD	% rythme	p
P1	27,3 \pm 0,7	3 \pm 1	12:50 (\pm 1h10')	14,62	0,0152
P2	32,6 \pm 0,7	4,5 \pm 1	12:55 (\pm 55')	25,41	0,0004
P3	30,8 \pm 0,6	1,5 \pm 0,9	11:55 (\pm 2h10')	5,35	0,2673
P4	99 \pm 5,5	14,7 \pm 7,8	1:05 (\pm 2h)	6,26	0,1801
P1-P2-P3-P4	42,8 \pm 1,8	3,3 \pm 2,6	12:05 (\pm 2h50')	15,37	0,0120
P1-P2-P3	28,7 \pm 0,3	5,3 \pm 0,3	13:20 (\pm 10')	57,27	0,0000

Les variations de la moyenne des concentrations des porcs P1, P2 et P3 sont représentées sur la figure 4.

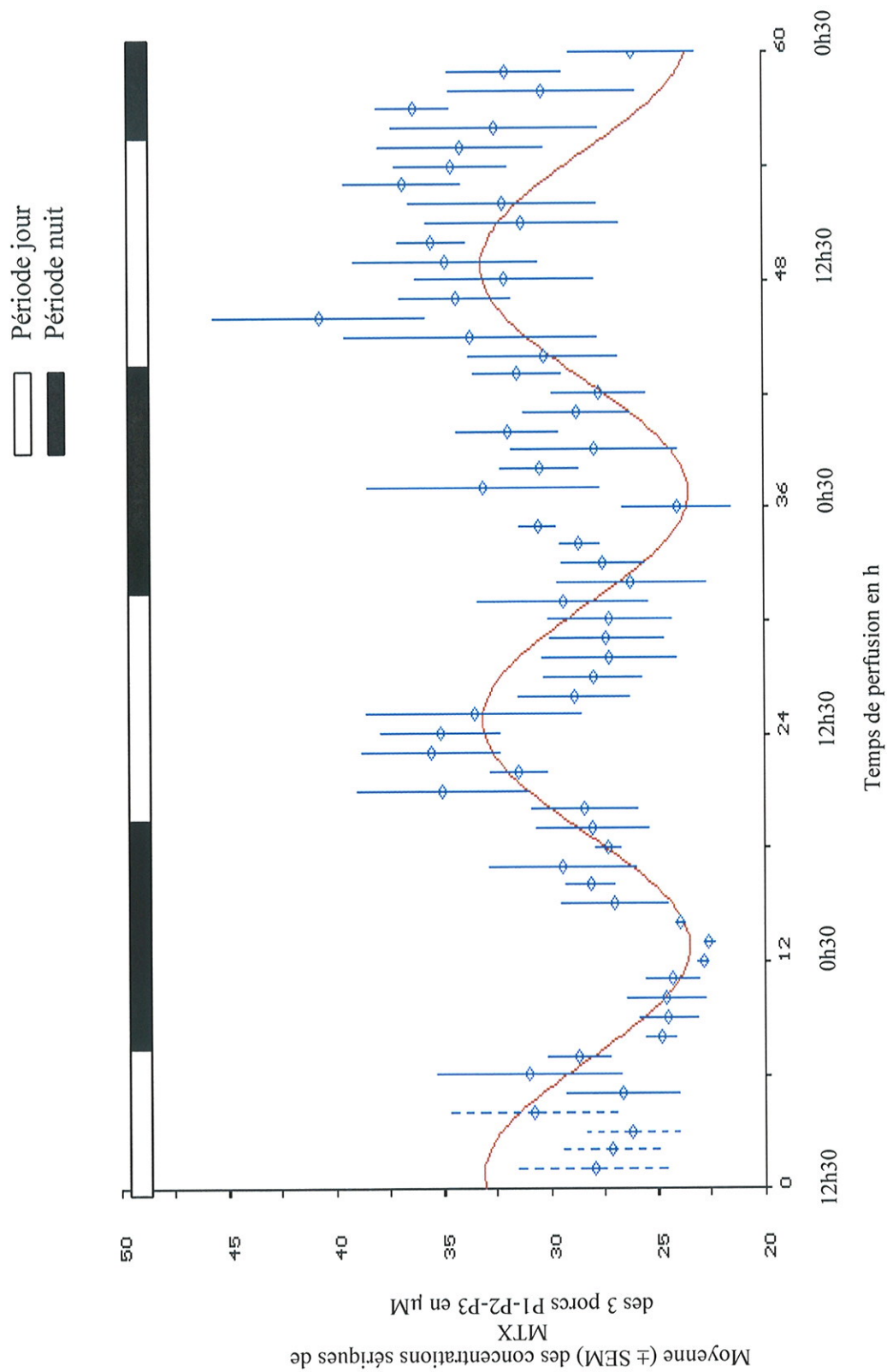


Figure 4 : Rythme circadien de la moyenne des concentrations (moyenne ± SEM) observées chez 3 porcs (P1, P2 et P3) et fonction sinusoïdale ajustée aux données par la méthode du cosinor.

V. 4. Discussion

Cette étude a mis en évidence un rythme circadien significatif des concentrations sériques de méthotrexate chez 2 porcs avec une acrophase située vers 13h00 et une tendance dans le même sens a été observée chez un 3^{ème}. Les concentrations groupées de ces 3 animaux présentent des variations circadiennes significatives qui expliqueraient une part non négligeable de la variabilité intra-individuelle (% rythme de 57%). Les valeurs maximales apparaissaient en milieu de jour.

Les résultats obtenus chez le 4^{ème} porc ont été distingués des autres. En effet, un surdosage caractérisé par des valeurs élevées des concentrations a provoqué chez cet animal des manifestations toxiques importantes. Les concentrations ne se trouvaient donc pas à l'état stable requis pour l'étude chronocinétique. Cette observation témoigne également de la grande variabilité inter-individuelle de la clairance du MTX, du moins sur ce modèle animal. A titre de comparaison, chez l'homme, l'administration d'une même intensité de dose peut conduire à des concentrations (et des clairances) variant dans un rapport de 1 à 10 d'un patient à l'autre.

Ces résultats semblent en faveur de l'existence d'un effet chronocinétique du méthotrexate, administré en perfusion continue, avec des concentrations maximales en milieu de période diurne (vers 13h00). Ils sont en accord avec les résultats d'une étude qui avait montré un rythme circadien du méthotrexate chez les rongeurs (Ohdo S. et col, 1997).

VI. LE 5-FLUOROURACILE (5-FU)

VI.1. Schéma d'administration et conditions particulières

VI.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques

La test-dose a consisté à administrer, à un porc de 40 kg, un bolus de 100 mg de 5-FU et à réaliser des prélèvements sanguins 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45 minutes après la fin de l'injection. Une clairance totale de 125 L/h et un volume de distribution dans le compartiment central de 4,5 L ont été obtenus à partir de calculs effectués sur la base d'un modèle pharmacocinétique monocompartimental.

La demi-vie du 5-FU étant courte, environ 2 minutes ici (elle varie de 6 à 22 minutes chez l'homme), la C_{ss} est rapidement atteinte et la perfusion longue n'a pas été précédée de l'administration d'une dose de charge.

VI.1.2. Dose administrée

Elle a été initialement calculée sur la base d'une AUC totale cible de 30 mg.L⁻¹.h soit une concentration à l'état stationnaire de 500 µg.L⁻¹ (Féty R. et col., 1998) en prenant en compte les paramètres déterminés par la test-dose. Toutefois, chez l'homme, la clairance totale est plus faible après administration d'un bolus (0,5 à 1,5 L/min) qu'après administration d'une perfusion longue continue de plusieurs jours (5 à 58 L/min) (Gamelin E., 1999). Ceci semble s'expliquer par un effet de premier passage hépatique et une saturation de la voie catabolique pour les concentrations élevées de 5-FU atteintes après l'administration d'un bolus (Berry & Erlichman, 1996). La clairance obtenue par la test-dose était probablement sous-estimée.

Ainsi, la dose de 5-FU (FLUOROURACILE TEVA[®], Teva Pharma SA, France) réellement perfusée (82,5 mg/h) a tenu compte du poids moyen des animaux soumis à l'expérimentation, soit 25 kg, et du rapport entre les valeurs de clairance mesurées chez l'homme après injection brève et après perfusion longue.

VI.2. Réalisation pratique de l'expérimentation

Les contrôles de débit de perfusion étaient satisfaisants.

Le dosage des reliquats de solution médicamenteuse recueillis lors des changements de seringues a montré la stabilité, au cours du temps, des concentrations perfusées. En effet, la variabilité des valeurs de concentration (C.V.= 6,7%) est tout à fait acceptable si l'on se réfère au coefficient de variation, à même concentration, déterminé par les mesures de répétabilité lors de la validation de la méthode de dosage (CV<10%).

Certains signes de toxicité se manifestant par des vomissements ont été observés chez P3 (vers T52). P4 a présenté des signes plus sévères : des tremblements importants ont été observés vers T47 et en fin d'expérimentation (à partir de T54), l'animal a été victime de vomissements, de secousses brutales et a présenté un comportement proche de la crise de tétanie. La perfusion de l'anticancéreux a dû alors être stoppée (environ 10 minutes) à différentes reprises.

VI.3. Résultats

Avant toute interprétation des résultats, la présence de pics correspondant à des concentrations élevées de 5-FU a été confirmée lors de nouvelles séries d'analyses. Un éventuel biais lié à la méthode de dosage a pu ainsi être écarté.

VI.3.1. Analyse graphique

L'évolution des concentrations sériques du 5-FU sur 60 heures chez les 4 porcs P1, P2, P3 et P4 est représentée sur la figure 5.

Les chronogrammes mettent en évidence une variabilité inter-individuelle importante. En effet, les concentrations moyennes observées sur 60 h sont de 628 ± 516 $\mu\text{g/L}$ (P1), 487 ± 191 $\mu\text{g/L}$ (P2), 1444 ± 1431 $\mu\text{g/L}$ (P3) et 2089 ± 1687 $\mu\text{g/L}$ (P4).

Les concentrations moyennes observées chez P1 et P2 sont voisines de la C_{ss} ciblée (500 $\mu\text{g/L}$) alors que celles observées chez P3 et P4 atteignent des valeurs plus élevées (jusqu'à un facteur 4 pour P4).

D'autre part, les concentrations varient largement au cours du temps chez un même porc : d'une concentration inférieure à la limite de quantification à 2614 $\mu\text{g/L}$ chez P1, de 119 à 1272 $\mu\text{g/L}$ chez P2, de 300 à 9326 $\mu\text{g/L}$ chez P3 et de 131 à 10148 $\mu\text{g/L}$ chez P4. Cette trop grande variabilité intra-individuelle, caractérisée par de nombreux pics de concentration, ne permet pas d'assimiler les concentrations moyennes à des concentrations stables à l'équilibre et d'en déduire les clairances totales.

Il est à noter que les concentrations de 5-FU observées chez P4 franchissent assez fréquemment 3000 $\mu\text{g/L}$ (concentration définie chez l'homme comme le seuil de toxicité sévère) ce qui peut expliquer les phénomènes toxiques apparus en fin d'expérimentation chez cet animal.

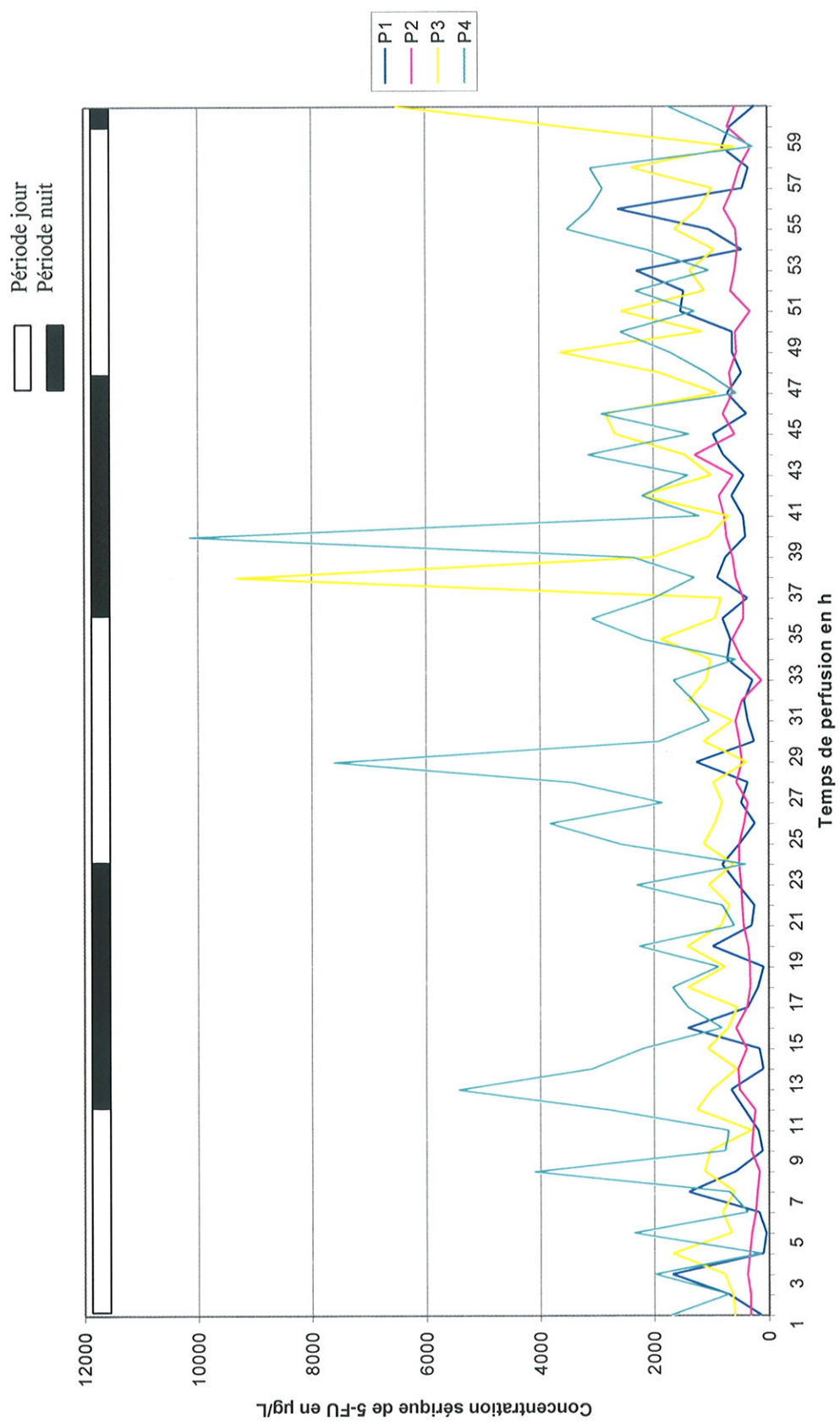


Figure 5 : Chronogrammes des concentrations sériques de 5-FU observés chez 4 porcs

Les valeurs d'AUC (tableau 8) suggèrent une exposition au médicament plus importante en période nocturne chez 3 des 4 porcs.

Tableau 8 : Valeur des AUC observées chez les 4 porcs (en $\mu\text{g/L.h}$)

	AUC totale Sur 60h	AUC Jour (Moyenne sur 12h)	AUC Nuit (Moyenne sur 12 h)
P1	37510,5	12625,4	7339,2
P2	28777,5	6468,4	8265,8
P3	83109,5	19807,1	26136,9
P4	123642,5	24855	31122,4

VI.3.2. Analyse statistique

L'étude inter-jour a mis en évidence des différences significatives entre les concentrations moyennes d'une période de 24h à l'autre chez les 3 porcs P1, P2 et P3. L'analyse de régression a montré que chez ces animaux les concentrations tendaient à augmenter au cours du temps. Seul P4 présentait des moyennes de concentrations constantes au cours des 60h.

Les concentrations moyennes observées la nuit sont significativement supérieures à celles observées le jour chez 2 porcs sur 3 (P2 et P3). Les concentrations sériques de P4 suivent la même tendance et celles de P1 une tendance inverse.

VI.3.3. Etude des fluctuations périodiques

- **Analyse individuelle**

L'analyse individuelle des concentrations sériques de 5-FU chez chacun des 4 porcs n'a mis en évidence un rythme circadien (période de 24h) significatif ($p < 0,02$) des

concentrations que pour P2. Ce rythme expliquerait 11,66 % de l'ensemble des variations avec un mesor estimé à $494 \pm 24,5$ µg/L, une amplitude à $94,9 \pm 34,6$ (soit environ 20% du mesor) et une acrophase située en milieu de période nocturne vers 3h30.

Par ailleurs un rythme ultradien significatif caractérisé par une période de 4h, a été détecté chez le porc P1 ($p < 0,003$).

Du fait de la présence de nombreux pics de concentration chez la plupart des animaux, une analyse a également été réalisée à partir des courbes de concentration lissées par la méthode de la moyenne mobile. Un point correspondait alors à la moyenne de 3 valeurs de concentration successives dans le temps. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Variations périodiques des concentrations sériques de 5-FU après lissage par moyenne mobile

	Période	Mesor en µg/L	Amplitude en µg/L	Acrophase	%rythme	p
P1	24h	622	167	12:30	14,16	0,015
P2	24h	500	102	3:30	14,15	0,013
P3	12h	1401	398	21:00	11,92	0,0305
P4	12h	2121	498	11:45	12,86	0,0227

Bien que statistiquement significatifs, les résultats figurant dans le tableau sont peu homogènes et très peu cohérents, notamment en ce qui concerne l'horaire très variable de l'acrophase.

Les données centrées ont également été analysées. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec les valeurs brutes : seul un rythme des concentrations sériques a été détecté chez P2, avec une période de 24h et une acrophase située à 4h00.

- **Analyse des données groupées**

L'utilisation des données groupées paraît difficilement justifiable ici du fait de l'importante divergence des résultats individuels. Néanmoins, les analyses effectuées à partir des moyennes mobiles poolées des 4 porcs ont montré l'existence d'un rythme circadien significatif ($p < 0,03$) de la concentration sanguine de 5-FU. Les valeurs des paramètres sont estimées à $926,8 \pm 36,5$ $\mu\text{g/L}$ pour le mesor, $166,3 \pm 50,3$ $\mu\text{g/L}$ pour l'amplitude et $15,2 \pm 1,2$ h (soit environ 00h30) pour l'acrophase. Le pourcentage de rythme de 13,09 % est relativement faible.

VI.4. Discussion

Différents rythmes significatifs des concentrations sériques de 5-FU ont été mis en évidence lors de cette étude. Cependant les caractéristiques de ces rythmes étaient très variables d'un porc à l'autre (différence des périodes et des horaires des acrophases) mais également chez un même porc (résultats différents selon le type de données prises en compte : brutes, lissées ou centrées). L'hétérogénéité et la contradiction des différents résultats les rendent difficilement exploitables. Cette hétérogénéité traduit là encore une forte variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques du 5-FU dans ce modèle animal.

Afin d'éliminer un biais lié au choix de la méthode de dosage, tous les échantillons sériques collectés chez un des porcs (P1) ont été contrôlés en utilisant la méthode HPLC développée par l'équipe de Gamelin (1997). Les analyses statistiques et l'étude des fluctuations périodiques réalisées à partir de cette seconde série de données confirmaient les résultats obtenus à partir de la première série de dosages.

Cette étude ne permet donc pas de conclure à l'existence de variations périodiques prévisibles et significatives des concentrations sériques du 5-FU.

Les résultats obtenus sont décevants par rapport aux attentes concernant cette molécule pour laquelle, lorsqu'elle est administrée en perfusion continue à débit constant, des variations circadiennes des concentrations plasmatiques auraient été montrées chez l'homme (Petit E. et col., 1988 ; Harris B.E. et col., 1990).

Dans ces conditions, il est logique de remettre en cause le modèle expérimental utilisé qui est peut-être inadapté, bien que le porc ait été décrit comme un modèle convenable pour l'étude de la pharmacocinétique des médicaments (Krishnan T.R et col., 1994). Les conditions expérimentales peuvent également être sujettes à discussion et plus particulièrement les doses administrées.

Cependant, les essais réalisés chez l'homme sont basés sur 3 études principales qui rapportent des résultats contradictoires concernant l'horaire de l'acrophase (Petit et col. et Metzger et col. décrivent une acrophase à 1h00 et 4h00 respectivement et Harris et col. décrivent une acrophase à 11h00). Par ailleurs, dans ces études :

- les analyses rapportées ne prennent pas en compte les données brutes mais les concentrations centrées sur la moyenne observée sur 24h
- la fréquence des prélèvements est moins grande que dans la présente étude : au maximum 1 prélèvement toutes les 3 heures ce qui aurait tendance à "gommer" d'éventuels pics de concentration tels que ceux qui ont pu être observés ici ;
- les résultats ne sont pas toujours homogènes ; tous les patients ne présentent pas forcément un rythme significatif (4 patients sur 7 dans l'étude de Petit E. et col., 1988) ou certains peuvent présenter un rythme inversé par rapport au rythme moyen (comme c'est le cas dans l'étude de Harris B.E. et col., 1990).

VII. LA DOXORUBICINE

VII.1. Schéma d'administration et conditions particulières

VII.1.1. Evaluation des paramètres pharmacocinétiques

Une dose test de 35 mg a été administrée en bolus I.V. (posologie usuelle en injection rapide) de doxorubicine à un porc de 30 kg et en prélevant un échantillon sanguin à 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45 minutes et 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 et 48 heures après la fin de l'injection.

Les calculs, effectués sur la base d'un modèle à 3 compartiments ont permis de déterminer une clairance totale de 44 L/h et un volume de distribution dans le compartiment central de 15 L. La demi-vie terminale d'élimination estimée à 25 h a justifié l'administration d'une dose de charge en début de traitement. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues chez l'homme (Canal P. et col., 1991).

VII.1.2. Dose administrée

La détermination du débit de perfusion s'est appuyée sur les résultats d'une étude de Bugat R. et col. (1989) réalisée chez l'homme au cours de laquelle la doxorubicine était administrée en perfusion continue pendant 96h. Cette étude a permis de définir une dose maximale recommandée de 20 mg/m²/j.

Ainsi chaque porc (n = 4) de poids compris entre 35 et 40 kg a reçu une perfusion de 0,8 mg/h, précédée d'une dose de charge de 0,27 mg (dose calculée pour atteindre rapidement une C_{ss} théorique de 18 ng/ml) de doxorubicine (ADRIBLASTINE[®], Pharmacia & Upjohn SA, France).

VII.2. Réalisation pratique de l'expérimentation

Le débit de la perfusion longue était constant tout au long de l'expérimentation (12,5 mL/h).

Les animaux n'ont présenté aucun signe de toxicité et aucun comportement anormal.

VII.3. Résultats

VII.3.1. Analyse graphique

L'évolution des concentrations sériques de doxorubicine sur 60 heures chez les 4 porcs est représentée sur la figure 6.

Les concentrations moyennes observées sur 60 heures varient au maximum d'un facteur 2,5 d'un porc à l'autre, elles sont égales à $25,75 \pm 12,95$ ng/mL (P1), $16,97 \pm 6,04$ ng/mL (P2), $41,19 \pm 27,87$ ng/mL (P3) et $30,19 \pm 7,76$ ng/mL (P4) pour une C_{ss} ciblée de 18 ng/mL.

Chez certains animaux la variabilité intra-individuelle est parfois importante, c'est le cas notamment du porc P3 dont les concentrations varient de 13,5 à 177,8 ng/mL. Les 3 autres porcs présentent une variabilité plus modérée : les concentrations minimales et maximales observées sont de 5,73 et 68,04 ng/mL pour P1, de 7,03 et 35,62 ng/mL pour P2 et de 15,36 et 60,36 ng/mL pour P4.

La comparaison des valeurs des AUC observées, chez chaque porc, en périodes diurne et nocturne ne permet pas de décrire une tendance générale. (tableau 10)

□ Période jour
■ Période nuit

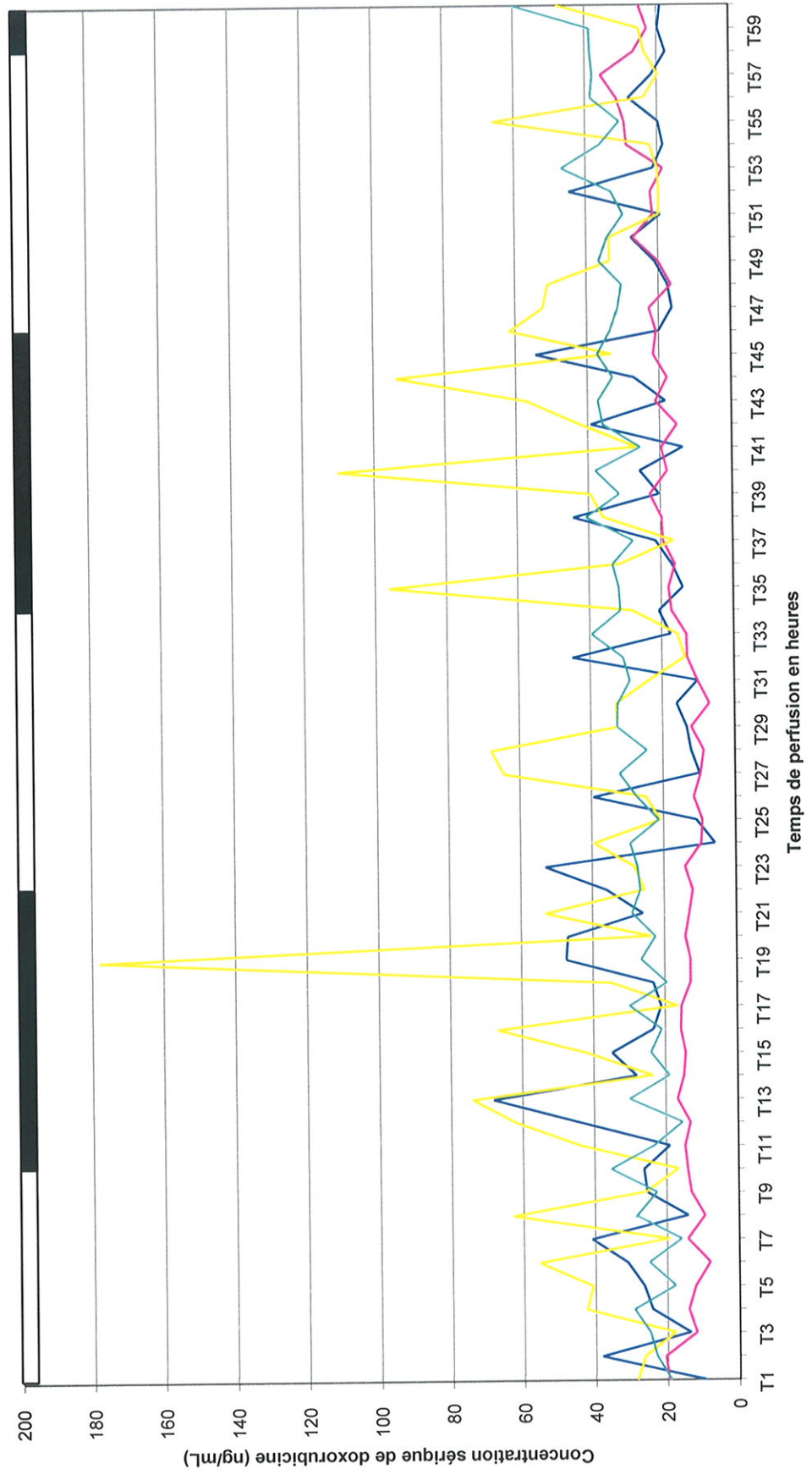


Figure 6 : Chronogrammes des concentrations sériques de doxorubicine observés chez 4 porcs

Tableau 10 : Valeur des AUC observées chez les 4 porcs (en ng/mL.h)

	AUC totale Sur 60h	AUC Jour (Moyenne sur 12h)	AUC Nuit (Moyenne sur 12 h)
P1	1527,6	273	315,1
P2	995,9	297,1	229
P3	2433,2	394,8	632,8
P4	1771,8	421,9	404

VII.3.2. Analyse statistique

L'étude inter-jour a montré que les concentrations observées chez 2 des 4 porcs, P2 et P4 tendaient à augmenter au cours des 60 heures. Pour les porcs P1 et P3, les concentrations étaient constantes sur toute la durée de l'expérimentation.

Pour les porcs P1 et P3, les concentrations observées en période nocturne sont significativement supérieures à celles observées en période diurne ($p < 0,05$ pour P1 et $p < 0,01$ pour P3). Aucune différence statistiquement significative n'est observée pour les porcs P2 et P4.

VII.3.3. Etude des fluctuations périodiques

L'analyse des données individuelles par la méthode du cosinor n'a mis en évidence un rythme circadien statistiquement significatif des concentrations de doxorubicine que pour un seul animal, P3 ($p < 0,04$). Ce rythme expliquerait 11,32 % de l'ensemble des variations avec un mesor de $42,9 \pm 3,5$ ng/mL, une amplitude de $13,4 \pm 4,9$ ng/mL et une acrophase située en période nocturne à 3h50.

L'analyse groupée des données de concentration de l'ensemble des porcs n'a pas montré de rythme statistiquement significatif.

VII.4. Discussion

Cette étude ne montre pas d'effet chronopharmacocinétique significatif de la doxorubicine puisqu'un rythme circadien (avec un pourcentage relativement faible) n'a été détecté que chez un seul porc. L'implication de la chronocinétique dans les variations périodiques de la toxicité de la doxorubicine observées chez l'homme n'est donc pas démontrée.

VIII. CONCLUSION

A notre connaissance, ce travail est la première étude chronopharmacocinétique conduite chez le porc. Les résultats obtenus montrent que ce modèle animal présente des caractéristiques pharmacocinétiques et physiologiques proches de celles de l'homme : valeur de paramètres pharmacocinétiques similaires (clairance totale, volume de distribution des médicaments étudiés) et rythme circadien du cortisol.

Une importante variabilité intra-individuelle des concentrations sériques des médicaments anticancéreux étudiés a été observée. Malgré une administration à débit constant (vérifié) des solutions médicamenteuses dont la stabilité a été contrôlée au cours du temps, les concentrations sériques mesurées chez chaque porc variaient au minimum d'un facteur 2.

D'autre part, une forte variabilité inter-individuelle était également observée. Pour une même dose administrée, dans les mêmes conditions et à des porcs de mêmes caractéristiques (provenance, race, sexe, poids) la concentration moyenne sur 60h variait de manière importante d'un porc à l'autre (d'un facteur 2,5 pour la vinorelbine, le méthotrexate et la doxorubicine jusqu'à un facteur 4 pour le 5-fluorouracile). L'inconvénient de ces variations est qu'elles augmentent le nombre d'animaux nécessaire pour démontrer une différence statistique. Mais l'existence d'une grande variabilité de la pharmacocinétique des mêmes médicaments chez l'homme (comme le méthotrexate) permet de ne pas exclure que le porc puisse constituer un modèle suffisamment représentatif de l'homme.

Précédemment, il n'avait pas été rapporté dans la littérature d'études chronopharmacocinétiques concernant les médicaments anticancéreux administrés en perfusion continue chez l'animal. La mise en place de ces expérimentations est relativement lourde et difficile, et elle exige des structures adaptées. Il n'est peut-être pas exclu que des

imperfections dans la réalisation des expérimentations soient partiellement responsables de la variabilité des résultats obtenus.

Il n'a pas été mis en évidence de variations circadiennes significatives et systématiques des concentrations sériques de vinorelbine et des concentrations sériques de doxorubicine. Aucune étude n'avait été précédemment publiée sur la chronocinétique de la vinorelbine, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal. La chronotoxicité de la doxorubicine avait été rapportée sans que la corrélation avec les concentrations sanguines soit étudiée.

Les résultats obtenus avec le 5-FU sont assez contradictoires selon les porcs, ce qui semble également être le cas des résultats précédemment publiés dans les études chez l'homme. Il semble exister un rythme significatif chez certains individus mais pas chez tous et l'acrophase de ce rythme peut être très différente d'un individu à l'autre. Cette variabilité est un argument en défaveur d'une administration chronomodulée du 5-FU basée sur la seule chronocinétique du médicament. Toutefois, cette administration chronomodulée, qui est effectuée en routine par certaines équipes cliniques, pourrait être justifiée par des variations chronesthésiques, dont les mécanismes restent à démontrer.

Un rythme significatif des concentrations de méthotrexate a été retrouvé pour 3 animaux, tandis que le 4^{ème}, victime de surdosage, a présenté des signes de toxicité importants ce qui a conduit à l'exclure de l'analyse de rythme. L'acrophase était située en milieu de période jour. Peu d'études cliniques avaient été précédemment réalisées et aucune n'utilisait une perfusion continue. Une étude réalisée chez l'enfant leucémique concluait à une réduction significative de la clairance en période nocturne. Au contraire, aucune influence de l'heure d'administration sur les paramètres pharmacocinétiques n'était observée dans une étude incluant des patients atteints de lymphomes.

Afin d'améliorer ce modèle animal, il pourrait être intéressant d'inclure des porcs plus âgés, susceptibles de présenter une plus grande maturité des fonctions physiologiques et une plus grande stabilité des rythmes biologiques, ou d'utiliser un autre site de prélèvement pour tenter de réduire la variabilité intra-individuelle des concentrations.

La présente étude, pragmatique, devrait être suivie de recherches plus approfondies, incluant un plus grand nombre de sujets, pour déterminer l'origine des variations cinétiques d'un médicament. En effet, la variation de plusieurs paramètres est possible (volume de distribution, clairance) et des méthodes appropriées devront être utilisées, comme le recours à des médicaments sonde des cytochromes P450 pour étudier le métabolisme; la mesure directe de la filtration glomérulaire, de l'excrétion et de la réabsorption tubulaire rénale... L'étude de tous ces marqueurs physiologiques peut être envisagée chez le modèle animal qu'est le porc.

Les médicaments anticancéreux étant caractérisés par un index thérapeutique étroit, la phase d'expérimentation animale semble indispensable, car elle fournit les données de base pour des essais cliniques ultérieurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackland SP, Ratain MJ, Vogelzang NJ, Choi KE, Ruane M, Sinkule JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of long-term continuous-infusion doxorubicin. *Pharmacol Ther*, 1989, 45, 340-347
- Berry BW, Erlichman C. Clinical pharmacology of anticancer drugs. In : Schildsky RL, Milano GA, Ratain MJ, editors. Principles of antineoplastic drug development and pharmacology. New York : M Dekker Inc., 1996, 81-85.
- Bruguerolle B. Chronopharmacokinetics. Current status. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 35(2), 83-94.
- Canal P, Sqalli A, De forni M, Chevreau C, Pujol A, Bugat R, Roche H, Oustrin J, Houin G, Chronopharmacokinetics of doxorubicin in patients with breast cancer. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991, 40, 287-291.
- Ekkel ED, Dieleman SJ, Schouten WGP, Portela A, Cornelissen G, Tielen JM, Halberg F. The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiol Behav*, 1996, 60(3), 985-989.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH, Crom WR, Boyett JM, Pui CH. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 1998, 338(8), 499-505.
- Féty R, Rolland F, Barberi-Heyob M, Hardouin A, Champion L, Conroy T, Merlin JL, Rivière A, Perrocheau G, Etienne MC, Milano G. Clinical impact of Pharmacokinetically-guided dose adaptation of 5-fluorouracil : results from a multicentric randomized trial in patients with locally advanced head and neck carcinomas. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 2039-2045.
- Filipski E, Amat S, Lemaigre G, Vincenti M, Breillout F, Lévi FA. Relationship between circadian rhythm of vinorelbine toxicity and efficacy in P388-bearing mice. *Pharmacology*, 1999, 289, 231-235.
- Gamelin EC, Danquechin-Dorval EM, Dumesnil YF, Maillart PJ, Goudier MJ, Burtin PC, Delva RG, Lortholary AH, Gesta PH, Larra FG. Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU. *Cancer*, 1996, 77(3), 441-451.
- Gamelin E, Boisdron-Celle, Turcant A, Larra F, Allain P, Robert J. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of halogenopyrimidines in plasma. *J Chromatogr B*, 1997, 695, 409-416.
- Gamelin E, Boisdron-Celle M. Dose monitoring of 5-fluoracil in patients with colorectal or head and neck cancer-status of the art. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999, 30, 71-79.
- Harris BE, Song R, Soong S, Diasio RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res*, 1990, 50, 197-201.
- Hrushesky WJ. Circadian timing of cancer chemotherapy. *Science*, 1985, 228(4695), 73-75.
- Husson MC, Becker A. Stabilités physicochimiques. Médicaments cancéreux. De la préparation à l'administration. Optimisation. Editions Médicales Internationales, Cachan, 1995, Collection APHIF.

- Ibrahim NK, Rahman Z, Valero V, Willey J, Theriault RL, Buzdar AU, Murray JL, Bast R, Hortobagyi GN. Phase II study of vinorelbine administered by 96-hour infusion in patients with advanced breast carcinoma. *Cancer*, 1999, 86(7), 1251-1257.
- Klemcke HG, Nienaber JA, Hahn GL. Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1989, 190(1), 42-53.
- Koren G, Ferrazzini G, Sohl H, Robieux I, Johnson D, Giesbrecht E. Chronopharmacology of methotrexate pharmacokinetics in Childhood leukemia. *Chronobiol Int*, 1992, 9(6), 434-438.
- Krishnan TR, Abraham I, Craig S. Use of the domestic pig as a model for oral bioavailability and pharmacokinetic studies. *Biopharm Drug Disposit*, 1994, 15, 341-346.
- Lachâtre F, Marquet P, Ragot S, Gaulier JM, Cardot P, Dupuy JL. Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2000, 738, 281-291.
- Lemmer B. Clinical chronopharmacology: the importance of time in drug treatment. Circadian clocks and their adjustment. *Ciba Foundation Symposium 183*, Wiley, Chichester, 1995.
- Lemmer B, Bruguerolle B. Chronopharmacokinetics. Are they clinically relevant? *Clin Pharmacokinet*, 1994, 26(6), 419-427.
- Levêque D, Jehl F. Clinical Pharmacokinetics of vinorelbine. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 31(3), 184-197.
- Lévi F, Zidani R, Brienza S, Dogliotti L, Perpoint B, Rotarski M, Letourneau Y, Llory JF, Chollet P, Le Roi A, Focan C. A multicenter evaluation of intensified, ambulatory, chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin as initial treatment of patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*, 1999, 85(12), 2532-2540.
- Mattes A, Witte K, Hohmann W, Lemmer B. PHARMFIT-a nonlinear fitting program for pharmacology. *Chronobiol Int*, 1991, 8(6), 460-476.
- Metzger G, Massari C, Etienne MC, Comisso M, Brienza S, Touitou Y, Milano G, Bastian G, Missel JL, Lévi F. Spontaneous or imposed circadian changes in plasma concentrations of 5-fluorouracil coadministered with folinic acid and oxaliplatin: relationship with mucosal toxicity in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 1994, 56(2), 190-201.
- Odoul F, Le Guellec C, Lamagnère JP, Breilh D, Saux MC, Paintaud G, Autret-Leca E. Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999, 13, 595-604.
- Ohdo S, Inoue K, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N. Chronotoxicity of methotrexate in mice and its relation to circadian rhythm of DNA synthesis and Pharmacokinetics. *Jpn J Pharmacol*, 1997, 75, 283-290.
- Petit E, Milano G, Lévi F, Thyss A, Bailleul F, Schneider M. Circadian Rhythm-varying plasma concentration of 5-fluorouracil during a five-day continuous venous infusion at a constant rate in cancer patients. *Cancer Res*, 1988, 48, 1676-1679.
- Ragot S, Sauvage FL, Rousseau A, Genet D, Dupuy JL, Tubiana-Mathieu N, Marquet P. *J Chromatogr B*, 2001, 753, 167-178.

- Reinberg A, Smolensky MH. Circadian changes of drug disposition in man. *Clin Pharmacokinet*, 1982, 7, 401-420.
- Reinberg AE, Labrecque G, Smolensky MH. Chronopharmacologie. Dans *Chronobiologie et chronothérapie*. Heure optimale d'administration des médicaments. Editions Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1991, 39-40.
- Robinson BA, Begg EJ, Colls BM, Jeffery GM, Sharman JR. Circadian pharmacokinetics of methotrexate. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 24, 397-399.
- Sabot C, Debord J, Rouillet B, Lotfi H, Lachâtre G, Merle L, Olivier JP. Bayesian estimation and population pharmacokinetic parameters of high dose methotrexate in osteosarcoma. *Clin Research & Reg affairs*, 1993, 10(4), 233-241.
- Sqalli A, Oustrin J, Houin G, Bugat R, Canal P, Carton M. Clinical chronopharmacokinetics of doxorubicin (DXR). *Annu Rev Chronopharmacol*, 1988, 5, 393-396.
- Stoller RG, Hande KR, Jacobs SA, Rosenberg SA, Chabner BA. Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity. *N Engl J Med*, 1977, 297, 630-634.
- Tampellini M, Filipinski E, Lévi F. Circadian variation of vinorelbine toxicity in mice. *Chronobiol Int*, 1995, 12(3), 195-198.
- Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1971, 33, 14-22.
- Witte K, Zuther P, Lemmer B. Analysis of telemetric time series data for periodic components using DQ-FIT. *Chronobiol Int*, 1997, 14(6), 561-574.
- Zhou XJ, Landi H, Breillout F, Rahmani R. Pharmacokinetics of navelbine after oral administration in the dog and the monkey. *Anti-cancer Drug*, 1993, 4(4), 511-515.

BON A IMPRIMER N° 334

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

La chronothérapie est une des stratégies utilisées pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux. Elle consiste à adapter la chimiothérapie aux rythmes circadiens, pour les médicaments dont les effets et/ou la pharmacocinétique présentent des variations prévisibles sur 24 heures.

Cette étude avait pour but la mise au point d'un modèle animal pour étudier la chronopharmacocinétique des médicaments anticancéreux, et la recherche d'un tel effet pour le 5-fluorouracile, la vinorelbine, le méthotrexate et la doxorubicine en utilisant ce modèle.

Les expérimentations ont été réalisées chez des porcs de 25 à 40 kg, exposés à un cycle obscurité/lumière 12h :12h. Chaque médicament anticancéreux étudié a été administré à 4 porcs par perfusion intraveineuse continue à débit constant pendant 60 heures. Les concentrations sériques des médicaments ont été mesurées toutes les heures. L'existence d'un rythme endogène de la sécrétion du cortisol a, de plus, été recherchée chez 4 animaux traités. La recherche des fluctuations périodiques a été effectuée au moyen de modèles statistiques spécifiques utilisant la méthode du cosinor.

Les résultats obtenus semblent montrer la pertinence du modèle animal étudié : les concentrations sériques de cortisol suivaient un rythme circadien et l'analyse des données de concentrations des médicaments a fourni des valeurs de paramètres pharmacocinétiques (en particulier de clairance totale) similaires à celles couramment observées chez l'homme.

Chez les porcs traités par méthotrexate, l'analyse globale des concentrations a montré un rythme circadien significatif ($p < 10^{-4}$), avec un maximum en milieu de période jour (13h00). S'il était confirmé chez l'homme, le rythme circadien observé avec le méthotrexate pourrait contribuer à l'optimisation de ce traitement. En revanche, il n'a pas été mis en évidence de variations périodiques significatives et systématiques des concentrations sériques de la vinorelbine, de la doxorubicine et du 5-fluorouracile.

DISCIPLINE : PHARMACIE

MOTS-CLES : Porc, Chronopharmacologie, Chronopharmacocinétique, Anticancéreux, Rythme circadien.
