

Modélisation physiologique des interactions métaboliques

Frédéric Y. Bois

▶ **To cite this version:**

Frédéric Y. Bois. Modélisation physiologique des interactions métaboliques. Environnement, Risques & Santé, 2009, 8 (5), pp.413-424. 10.1684/ers.2009.0287 . ineris-00961942

HAL Id: ineris-00961942
https://ineris.hal.science/ineris-00961942

Submitted on 20 Mar 2014

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.

MODÉLISATION PHYSIOLOGIQUE DES INTERACTIONS MÉTABOLIQUES

Frédéric Y. Bois, INERIS, France.

Adresse :

Fréderic Yves Bois
INERIS
Parc ALATA, BP2
60550 Verneuil en Halatte
France
+33 3 44 55 65 96
frederic.bois@ineris.fr

Mots-clés : interactions métaboliques, mélanges toxiques, modélisation physiologique, toxicologie prédictive

Résumé

La modélisation des interactions métaboliques entre substances chimiques est *a priori* une tâche d'une redoutable complexité. Nous présentons ici une nouvelle approche et de nouveaux outils capables de faciliter ce développement. Des modèles individuels de voies métaboliques sont automatiquement agrégés et couplés à un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK) générique, à l'aide du logiciel GNU MCSim. Le modèle global ainsi créé est capable de simuler les interactions entre un nombre théoriquement illimité de substances. Le temps de développement du modèle n'augmente que linéairement avec le nombre de substances considérées, alors que le nombre d'interactions possibles croît exponentiellement. L'approche est illustrée dans le cas d'un réseau métabolique simulé impliquant 30 substances en mélange. Le comportement qualitatif et quantitatif de ce réseau est analysé à l'aide de simulations stochastiques. Pour le cas étudié, le nombre d'interactions significatives, au regard des incertitudes et de la variabilité affectant la pharmacocinétique et le métabolisme de ces substances, est bien inférieur au nombre d'interactions théoriquement possibles.

Abstract

Modeling metabolic interactions between chemicals can be a formidable model development task. Here I demonstrate a new approach and the capabilities of new tools to facilitate that development. Individual models of metabolic pathways are automatically merged and coupled to a template physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model, using the GNU MCSim software. The global model generated is very efficient and able to simulate the interactions between a theoretically unlimited number of substances. Development time increases only linearly with the number of substances considered, while the number of possible interactions increases exponentially. I show an example of application of that approach to the prediction of the kinetics of a mixture of 30 arbitrary chemicals. The qualitative and quantitative behavior of the corresponding pathway network is analyzed using Monte-Carlo simulations. In our example, the number of significant interactions, given the uncertainty and variability in pharmacokinetics and metabolism of those substances, is much lower than the theoretically possible number of interactions.

Introduction

L'analyse et la prédiction des interactions entre toxiques est souvent conçue comme une entreprise expérimentale vouée à l'échec. L'utilisation de plans d'expérimentations factoriels, par exemple, permet d'étudier systématiquement ces interactions, mais leur complexité croit plus qu'exponentiellement avec le nombre de substances considérées (Bois *et al.*, 1986, 1988). Alors que le règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), qui considère les substances chimiques individuellement, est déjà très ambitieux avec environ 100.000 substances produites, on imagine combien elle le serait davantage si elle devait tenir compte de leurs 4.999.950.000 interactions possibles (en ne considérant que les couples de produits !) La voie expérimentale est donc clairement impraticable, sauf pour des mélanges fixes bien identifiés, et d'autres solutions doivent être explorées.

Partant de considérations fondamentales, il est clair que les interactions sont crées par des interférences au niveau de la pharmacocinétique, des voies métaboliques, et des voies de régulation ou de signalisation cellulaires. Justement, l'étude détaillée de ces voies avance rapidement (Demin and Goryanin, 2009). Bien qu'extrêmement complexe, une approche fondamentale n'est pas forcement sujette à la même "malédiction dimensionnelle" que l'approche expérimentale, comme nous le montrons dans cet article. Pour réduire encore le problème, et par souci de simplicité, nous nous intéresserons ici seulement aux interactions métaboliques, source bien connue de synergies ou d'antagonismes entre substances. Ces interactions sont dues au fait qu'un nombre relativement limité de molécules d'enzymes catalysent les réactions endogènes et le métabolisme des xénobiotiques. Il en découle des goulots d'étranglement, prévisibles, dans la détoxication ou l'activation des substances chimiques par les organismes vivants.

Les modèles pharmacocinétiques physiologiques (PBPK) sont souvent utilisés pour analyser et prédire la cinétique et le métabolisme des substances dans le corps (Bois, 2003 ; Micallef *et al.*, 2005, Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2007). Dans ce cadre, la cinétique conjointe de mélanges de substances chimiques a déjà été étudiée, l'exemple le plus abouti étant celui du mélange benzène, toluène, éthylbenzène, xylène (Haddad *et al.*, 1999). Cependant, cet exercice est difficile lorsque l'on part d'une description Michaelienne du métabolisme (Michaelis et Menten, 1913), car le nombre de paramètres nécessaire augmente aussi vite que la taille des expérimentations factorielles mentionnées plus haut. Dans ces conditions, la modélisation n'est guère plus avantageuse que l'expérimentation, et d'ailleurs l'étude de Haddad *et al.* n'a jamais été reproduite pour d'autres mélanges.

Nous présentons ici une approche nouvelle, profitant de nouveaux outils et standards disponibles dans le cadre de la biologie systémique (*cf.*, http://systems-biology.org). Des descriptions individuelles des réactions enzymatiques du métabolisme de chaque substance sont tout d'abord établies en "Systems Biology Markup Language" (SBML). Ces modèles primaires sont ensuite agrégés automatiquement et couplés à un modèle PBPK global, capable de simuler l'ensemble de la pharmacocinétique des

substances étudiées, y compris les interactions métaboliques. Le nombre de paramètres nécessaire est simplement proportionnel au nombre de substances, ce qui représente une économie substantielle d'information. La faisabilité de cette approche est illustrée ici à l'aide d'un réseau simulé de 60 substances et métabolites, interagissant avec 10 enzymes du métabolisme hépatique. Le fait que ce soit un réseau simulé, et donc connu, nous permet de faire un certain nombres d'analyses qualitatives, en plus d'analyses quantitatives, sur l'impact des interactions entre substances en mélange dans le corps.

Méthodes

Schéma général

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la modélisation mécaniste des interactions peut être très complexe, même en se limitant aux interactions pharmacocinétiques et métaboliques. Notre approche peut se résumer par la devise "diviser pour mieux régner".

Le principe est de :

- Définir un modèle PBPK général "patron" (au sens de forme à reproduire) applicable à toutes les substances considérées (par exemple, le modèle présenté Figure 1). Un tel modèle est nécessaire pour décrire la relation entre l'exposition personnelle à une substance et sa concentration dans le foie ou tout autre site de métabolisme, qui conditionne les interactions avec les autres substances ;
- Développer pour chaque substance et chaque réaction métabolique de cette substance un modèle codé en SBML. Il est nécessaire à cette étape de ne pas passer par une formulation simplifiée de type Michaelis-Menten, mais de tenir compte des quantités d'enzymes et de complexes enzyme-substrat en présence.
- Construire automatiquement un modèle global de transport de l'ensemble des substances dans le corps et de leur métabolisme, sur la base des éléments précédents.
- Ce modèle peut ensuite être utilisé pour faire des simulations prédictives des interactions entre substances et étudier le comportement de ce système complexe mais représentatif de la réalité des expositions des populations humaines.

Pour ce faire, nous avons amélioré le logiciel libre *GNU MCSim* (Bois et Maszle, 1997; http://www.gnu.org/software/mcsim). *GNU MCSim* version 5.3.0 reconnaît les compartiments définis par les modèles SBML, pourvu qu'ils aient aussi été définis dans le modèle PBPK général, et y place automatiquement les réactions biochimiques spécifiées. Les sections suivantes décrivent le détail des modèles utilisés.

Modèle PBPK de circulation des substances et de leurs métabolites

Les modèles PBPK sont des modèles mathématiques de l'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) des substances chimiques dans le corps humain ou animal (il existe des modèles phy-

siologiques applicables aux plantes, mais il ne sont pas identifiés par l'acronyme PBPK). Ce sont des modèles compartimentaux, dans lesquels les compartiments correspondent à des organes ou tissus prédéfinis, interconnectés principalement par les flux sanguins. L'approche PBPK est de plus en plus utilisée en évaluation des risques toxicologiques ou dans la recherche et le développement de substances médicamenteuses (Bois, 2003, Barton et al., 2007, Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2007, Loizou *et al.*, 2008).

Un système d'équations différentielles correspondant peut être écrit, avec des paramètres représentant les flux sanguins, les volumes des organes *etc*., pour lesquels de l'information est disponible dans la littérature scientifique (Bois et Paxman, 1992 ; Woodruff et Bois, 1993). L'intégration numérique de ce système différentiel permet de calculer la quantité et la concentration de la substance considérée dans chaque compartiment, en fonction du temps et de la dose d'administration. Certes, cette description du corps est sommaire, mais un compromis doit être atteint entre la précision (et donc la complexité) et la facilité d'emploi (simplicité). Le modèle PBPK utilisé pour ce travail est capable de décrire la pharmacocinétique de nombreuses substances dans le corps humain (voir Figure 1). Il basé sur celui décrit dans Bois (2003). Ce modèle utilise quatre équations différentielles (le poumon est décrit par une simple équation algébrique faisant l'hypothèse d'une mise à l'équilibre instantané) et 10 paramètres physiologiques : masse corporelle, volumes des muscles et de la peau, graisses, foie et viscères, flux sanguins correspondants, ventilation pulmonaire et rapport ventilation pulmonaire sur perfusion (*i.e.*, sur débit cardiaque). Six paramètres (coefficients de partage sang/air, muscles/air, graisses/air, foie/air, viscères/air, et clairance d'élimination urinaire) sont spécifiques de la substance considérée. Les équations et les paramètres du métabolisme sont définis à l'aide de modèles SBML décrits dans la section suivante.

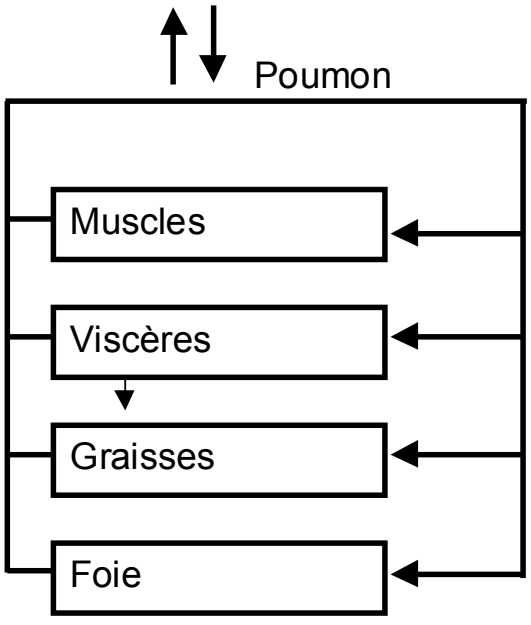


Figure 1: Représentation schématique du modèle pharmacocinétique physiologique utilisé pour décrire le transport des substances modélisées dans le corps humain. Les

échanges avec l'air se font au niveau du poumon. L'excrétion urinaire se fait à partir du rein, parmi les viscères. Le métabolisme de chaque substance a lieu dans le foie.

Le programme *GNU MCSim* version 5.3.0 permet de définir ce modèle comme un patron à utiliser pour chaque substance (et ses métabolites) d'un réseau de réactions enzymatiques. Dans ce cas, les équations du modèle sont clonées (dupliquées) pour chaque produit et rassemblées pour former un large système d'équations différentielles décrivant la pharmacocinétique simultanée de toutes les substances étudiées. Dans ce système, les paramètres physiologiques (par exemple le volume du foie) gardent la même valeur quel que soit le produit (voir Tableau 1), mais les valeurs des paramètres spécifiques peuvent différer d'une substance à l'autre.

Tableau 1: Valeurs des paramètres physiologiques du modèle PBPK présenté Figure 1.

Paramètre [(a)]	Symbole	Valeur
Ventilation pulmonaire	F_p	8,0
Rapport ventilation sur perfusion	R	1,14
Fractions de flux sanguin		
Graisses	f_g	0,09
Foie	f_f	0,24
Muscles et peau	f_m	0,18
Viscères	f_v	– [(b)]
Volumes [(c)]		
Corporel total	V_t	75
Graisses	V_g	18
Foie	V_f	1,7
Muscles et peau	V_m	– [(d)]
Viscères	V_v	6

(a) Unités : les volumes sont en litres, et les flux en litres/min.

(b) La fraction de flux sanguin vers les viscères est calculée par différence entre 1 et la somme des fractions de flux vers les autres compartiments.

(c) Ces volumes correspondent à ceux d'une femme de 30 ans (Bois, 2003).

(d) Le volume du compartiment muscles et peau a été calculé par différence entre le volume corporel total (réduit de 10% pour en soustraire les os) et les autres volumes.

Modèles SBML primaires des réactions métaboliques impliquées

Le modèle PBPK ci-dessus (à la différence de beaucoup d'autres) n'inclut pas les réactions métaboliques affectant les substances auxquelles l'individu est exposé. Les réactions enzymatiques du métabolisme de chaque substance pourraient avoir lieu dans n'importe quel compartiment du modèle, mais nous avons choisi ici de ne considérer que le métabolisme hépatique. Le problème reste tout de même de décrire efficacement les cascades de réactions pour l'ensemble des substances considérées en plus des éventuels mécanismes de transport et d'élimination des métabolites intermédiaires et finals (cette partie transport étant prise en charge par le modèle PBPK ci-dessus). Chaque réaction métabolique requiert un ensemble d'équations différentielles décrivant à minima la formation du complexe enzyme-substrat et sa dissociation en enzyme et produit (soit 4 équations : pour le substrat, l'enzyme libre, le

complexe, et le produit). Imaginons 30 substances (échantillon de ce qui se trouve habituellement dans l'air intérieur des bâtiments) formant 30 métabolites hépatiques, le tout étant distribué dans le corps selon le modèle PBPK de la Figure 1. Le modèle à écrire comprendrait un total de 360 équations et environ 450 paramètres. On voit immédiatement la difficulté et même l'impossibilité pratique du développement manuel d'un tel modèle.

C'est à ce stade qu'interviennent les concepts de biologie systémique. Le besoin de traiter ensemble de nombreuses réactions biologiques s'est posé depuis longtemps à la biologie intégrative. La solution a été de développer un ensemble d'outils, dont le "Systems Biology Markup Language" (SBML). SBML définit une syntaxe conventionnelle capable de représenter de façon compacte des réseaux de réactions biochimiques (*cf.* http://sbml.org). Le SBML, défini par Hucka *et al.* (2003), est maintenu depuis par une communauté internationale d'utilisateurs. SBML permet d'utiliser, entre autre, un codage symbolique uniforme des espèces biochimiques et de leurs réactions. La Figure 2 est un exemple graphique de réaction enzymatique primaire (simple).

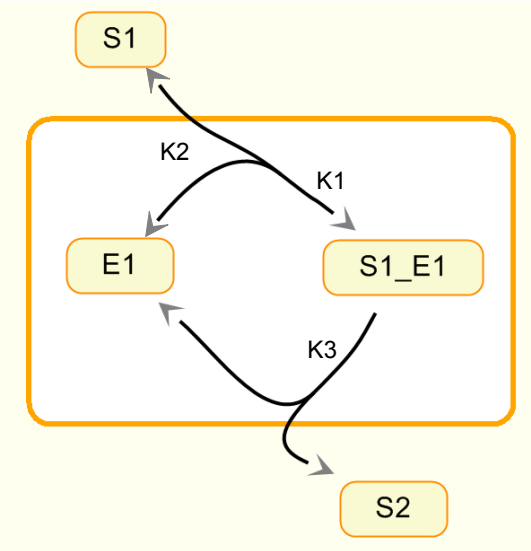


Figure 2: Représentation schématique d'une réaction enzymatique primaire entre le substrat S1 et l'enzyme E1 pour former le produit S2 après formation du complexe S1E1. La réaction S1+E1→S1E1 est supposée être réversible.

La Figure 3 (encadré) donne le texte du modèle SBML correspondant aux réactions de la Figure 2. On y retrouve les réactants, les produits, les réactions, leurs paramètres, et leur formule, *etc*., en bref tout ce qui permet de définir et de simuler sans ambiguïté les réactions spécifiées. Les modèles sont décomposés en éléments explicitement définis, et leur représentation ne fait pas directement appel à un ensemble d'équations différentielles ou toute autre représentation mathématique spécifique. Ceci facilite l'interprétation du modèle, sa traduction et son intégration dans un ensemble plus large par un logiciel tel que *GNU MCSim*. Étant donné une série de modèles SBML, *GNU MCSim* concatène

automatiquement, pour une même espèce chimique, les termes différentiels découlant de toutes les réactions mettant en jeu cette substance dans l'ensemble de modèles SBML fournis. Ceci en respectant, bien sur les lois de conservation de masse. De plus, les substances placées (en SBML) hors de tout compartiment (par exemple S1 et S2 dans la Figure 2) sont automatiquement distribuées dans tous les compartiments du modèle PBPK patron (en créant une série d'équations différentielles identiques à celles du modèle PBPK mais spécifiques de la substance considérée).

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<sbml level = "1" version = "2">
 <model name = "Example">
  <listOfCompartments> <compartment name = "Liver"> </listOfCompartments>
  <listOfSpecies>
   <species name = "E1"> <species name = "S1"> <species name = "S1_E1">
   <species name = "S2"> </listOfSpecies>
  <listOfParameters>
   <parameter name = "K1"> <parameter name = "K2">
   <parameter name = "K3"> </listOfParameters>
  <listOfReactions>
   <reaction name = "J0_R1">
    <listOfReactants>
     <speciesReference species = "S1">
     <speciesReference species = "E1"> </listOfReactants>
    <listOfProducts>
     <speciesReference species = "S1_E1"> </listOfProducts>
    <kineticLaw formula = "K1*S1*E1 - K2*S1_E1"/> </reaction>
   <reaction name = "J1_R1">
    <listOfReactants>
     <speciesReference species = "S1_E1"> </listOfReactants>
    <listOfProducts>
     <speciesReference species = "S2">
     <speciesReference species = "E1"> </listOfProducts>
    <kineticLaw formula = "K3*S1_E1"> </reaction>
  </listOfReactions>
 </model>
</sbml>
```

Figure 3: Description en SBML des réactions de la Figure 2. Les balises SBML ont été simplifiées (en enlevant par exemple les spécifications de stœchiométrie) pour la clarté de la présentation.

Simulation d'un réseau de réactions métaboliques en interactions

Afin de valider l'approche et ses outils, et d'explorer les propriétés théoriques d'un réseau suffisamment complexe, un ensemble de réactions métaboliques primaires (selon le schéma de la Figure 2) a été simulé sur la base d'une liste de 60 substances hypothétiques. Pour 30 substances parentes, une ou deux (à probabilité égale) réactions métaboliques avec 10 enzymes ont été générées aléatoirement. Les substances produites ont aussi été tirées au hasard parmi les 30 substances parentes (générant des réactions croisées) et 30 autres substances (purs produits terminaux). Les tirages aléatoires précédents ont été faits suivant des lois discrètes uniformes. Les enzymes et complexes enzyme-substrat ont été

supposés localisés dans le foie. Les substances parentes et les métabolites ont été définis comme circulant, et donc distribués selon les modèles PBPK générique de la Figure 1.

Les substances S1 à S10 (groupe *A*) sont supposées être des produits naturels, tels que ceux présents dans la nourriture (phénols, *etc.*), non volatils, absorbés journellement à relativement forte dose. Les substances S11 à S20 (groupe *B*), ont été assignées des paramètres caractéristiques de substances volatiles, absorbées et éliminées par la voie pulmonaire, le métabolisme et la voie urinaire. Les substances S21 à S30 (groupe *C*) parentes et les métabolites terminaux (groupe *D*, identifiés par des numéros compris entre 31 et 60) ont été supposés non-volatils, éliminables hors de l'organisme par la voie urinaire.

Les paramètres du modèle PBPK et les constantes de réaction métaboliques spécifiques de ces substances ont été soit tirés aléatoirement dans les distributions indiquées dans les Tableaux 2 et 3, soit fixés à la valeur moyenne des distributions, selon les calculs à faire.

Logiciels

Le logiciel *GNU MCSim* version 5.3.0 (http://www.gnu.org/software/mcsim) a été utilisé pour la génération et l'ensemble des calculs du modèle complet. Un programme spécifique a été codé en langage C, et compilé à l'aide de gcc v3.3.3 sous Linux, pour analyses qualitatives du réseau métabolique (recherche récursive des parents). JDesigner 2.1c et la suite de logiciels Systems Biology Workbench 2.7.8 (http://sbw.kgi.edu/index.htm) ont été utilisés pour générer la Figure 4. Les autres graphiques ont été générés à l'aide de Kaleidagraph v4.02 et de R v2.8.1.

Tableau 2: Valeurs des paramètres non-physiologiques spécifiques des substances non-volatiles.

Paramètre [(a)]	Symbole	Distribution [(b)]
Coefficient de partage sang/air	R	– [(c)]
Coefficient de partage tissus /sang		
Graisses	P_g	$N(1, 0.3, 0.5, 2)$
Foie	P_f	$N(1, 0.3, 0.5, 2)$
Muscles et peau	P_m	$N(1, 0.3, 0.5, 2)$
Viscères	P_v	$N(1, 0.3, 0.5, 2)$
Constantes métaboliques		
Réaction E + S $\rightarrow$ ES	K_1	$N(50, 50, 5, 200)$
Réaction ES $\rightarrow$ E + S	K_2	$N(50, 50, 5, 200)$
Réaction ES $\rightarrow$ E + P	K_3	$N(0.1, 0.1, 0.01, 1)$
Clairance d'élimination rénale	K_e	$N(0.05, 0.1, 0.005, 0.5)$

(a) Unités : Les coefficients de partage sont sans dimension, les constantes métaboliques sont en min^{-1} et la clairance en litres/min.

(b) $N(\mu, \sigma, min, max)$: distribution normale de moyenne μ et deviation standard σ, tronquée au delà de *min* et *max*.

(c) Valeur en théorie infinie, fixée à 10^9 pour les besoins du calcul.

Tableau 3: Valeurs des paramètres non-physiologiques spécifiques des substances volatiles.

Paramètre [(a)]	Symbole	Distribution [(b)]
Coefficient de partage sang/air	R	$N(10, 5, 1, 20)$
Coefficient de partage tissus /sang		
Graisses	P_g	$N(10, 5, 1, 20)$
Foie	P_f	$N(3, 3, 0.5, 10)$
Muscles et peau	P_m	$N(3, 3, 0.5, 10)$
Viscères	P_v	$N(3, 3, 0.5, 10)$
Constantes métaboliques		
Réaction E + S $\rightarrow$ ES	K_1	$N(50, 50, 5, 200)$
Réaction ES $\rightarrow$ E + S	K_2	$N(50, 50, 5, 200)$
Réaction ES $\rightarrow$ E + P	K_3	$N(0.1, 0.1, 0.01, 1)$
Clairance d'élimination rénale	K_e	$N(0.05, 0.1, 0.005, 0.5)$

(a) Unités : Les coefficients de partage sont sans dimension, les constantes métaboliques sont en min^{-1} et la clairance en litres/min.

(b) $N(\mu, \sigma, min, max)$: distribution normale de moyenne μ et deviation standard σ, tronquée au delà de *min* et *max*.

Résultats

Simulation d'un réseau métabolique

La Figure 4 présente graphiquement le réseau métabolique simulé. Le réseau est relativement complexe et fortement interconnecté, comme peuvent l'être les schémas métaboliques naturels. Le groupe *D* ne comprend que 15 substances (au lieu de 30) car la génération aléatoire des réactions n'a pas utilisé toutes les substances possibles. Le réseau de la Figure 4 a servi de base aux simulations et aux résultats suivants.

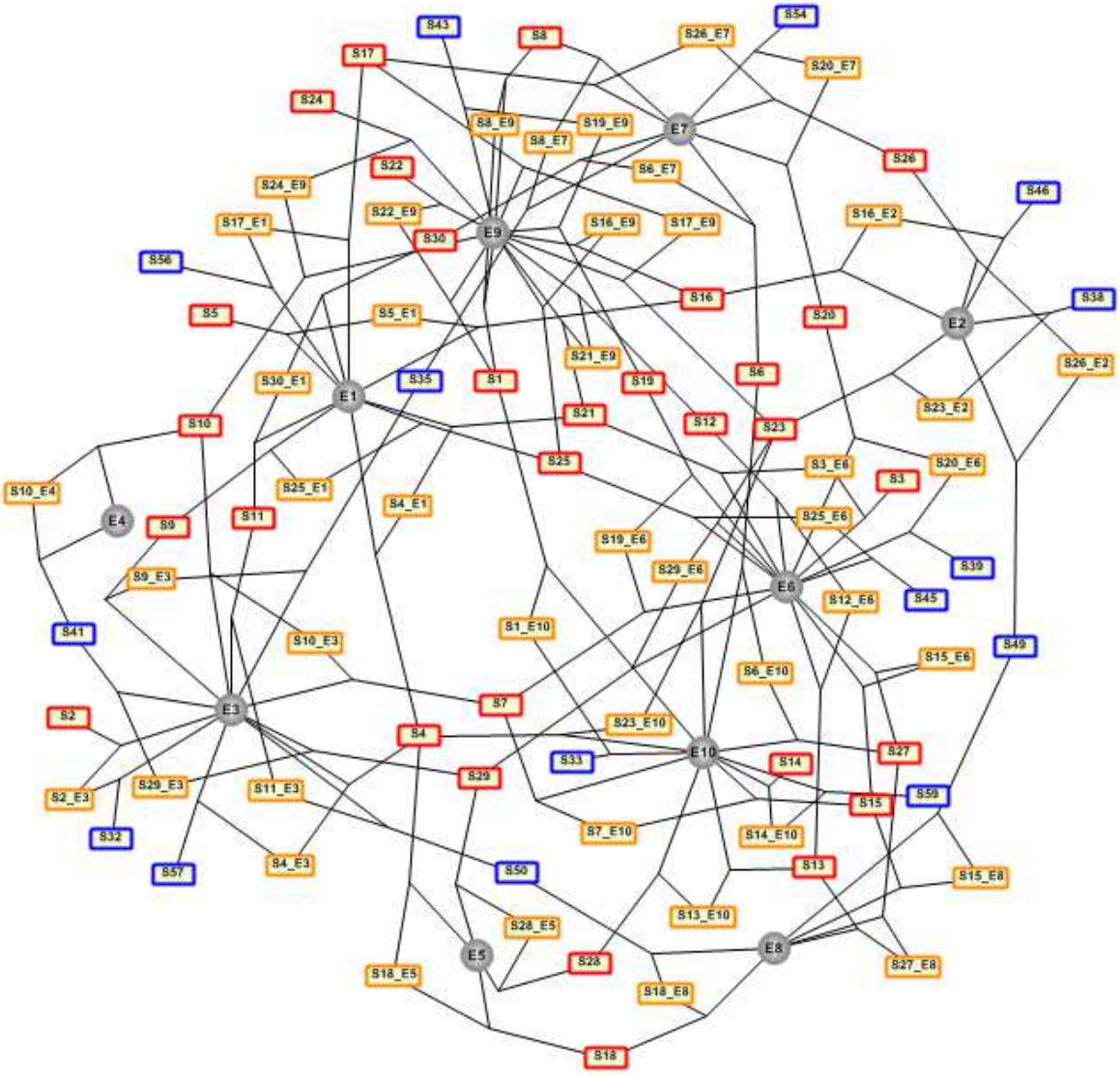


Figure 4: Exemple d'un réseau de métabolisme hépatique de 30 substances hypothétiques (en rouge). Les enzymes sont figurées en gris, les complexes enzyme-substrat en jaune, et les produits terminaux en bleu. Les substances parentes (groupes *A*, *B*, *C*, voir texte) et les métabolites (groupe *D*) se distribuent chacun dans le corps selon le modèle PBPK de la Figure 1 (les compartiments de distribution ne sont pas figurés, afin de ne pas surcharger le dessin.)

Analyse qualitative des interactions

Une première série d'analyses a permis d'évaluer "l'étendue" des interactions possibles entre les substances du réseau présenté Figure 4. Tout d'abord, du fait du chaînage des réactions métaboliques, l'introduction de chaque substance, prise individuellement, dans le corps (par inhalation pour les substances volatiles, ou par ingestion pour les autres) entraîne la formation d'un certain nombre d'autres. La Figure 5 indique pour chaque substance parente (groupes *A*, *B*, et *C*) administrée seule, l'ensemble (sur la ligne correspondante) des substances (des groupes *A* à *D*) qu'elle génère. Du fait de boucles et de sous-réseaux communs, un certain nombre de substances engendrent un ensemble comparable de sous-produits. La Figure 5 a été produite par une analyse théorique du réseau de la Figure 4, vérifiée par une analyse par simulation numérique (simulation de l'administration et observation des sorties du modèle). Il est possible d'étendre cette analyse en déterminant l'ensemble des substances théoriquement affectées (par production directe *et* indirectement par compétition enzymatique et donc par interaction) par chacune des substances des groupes *A*, *B*, et *C* lors de l'administration *simultanée* de ces 30 substances. On trouve alors, dans notre exemple, que le métabolisme de chaque substance est directement ou indirectement affecté par chaque autre substance. L'ensemble des interactions seules est donc l'inverse de celle de la Figure 5. On voit clairement que les pures compétitions métaboliques jouent potentiellement un rôle très important dans la cinétique et l'effet des substances simulées ici.

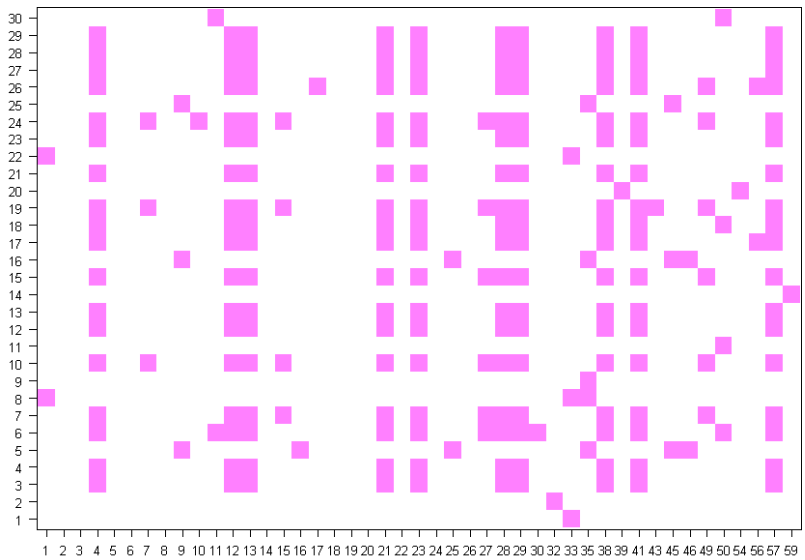


Figure 5 : Carte de la génération de produits par chaque substance parente administrée seule (par exemple, S1 ne génère que S33). La carte des pures interactions est la complémentaire de celle ci (les cases sombres devenant claires et vice-versa).

Les analyses précédentes sont qualitatives et basées sur la seule structure du réseau métabolique. Dans la réalité, et pour paraphraser Paracelse, c'est la dose qui fait l'interaction. À des doses suffisamment faibles, les compétitions enzymatiques ne sont plus opérantes (car le système devient linéaire et la quantité d'enzymes disponible n'est plus un facteur limitant) et le métabolisme de substances co-administrées devient la simple somme des métabolismes individuels. La section suivante explore ces aspects quantitatifs.

Analyse quantitative

La Figure 6 montre l'évolution dans le temps des concentrations veineuses des substances des groupes *A* à *D* lors de la co-administration des substances des groupes *A*, *B*, et *C*. Ces résultats ont été obtenus en intégrant dans le temps le modèle global décrivant la pharmacocinétique et le métabolisme des substances des groupes *A* à *D* (*cf.* Figure 4). Ce modèle global comprend 279 variables d'état (les quantités de substances et de métabolites dans les divers compartiments du modèle PBPK, et les quantités d'enzymes et de complexes enzyme-substrat dans le foie), et donc 279 équations différentielles, 462 paramètres, ainsi que toutes les entrées (ici, les quantités inhalées de substances du groupe *B*, ou les quantités ingérées de substances des groupes *A* et *C*) et les sorties nécessaires (*e.g.*, les concentrations dans les divers organes). Les paramètres ont été fixés à leurs valeurs moyennes données dans les tableaux 2 et 3. Les quantités initiales des variables d'état étaient nulles, sauf pour les enzymes, présentes à raison de 1 mM chacune (valeur arbitraire) dans le foie. Les doses ou taux d'ingestion par minutes étaient fixés à une valeur élevée (0,1 mM) pendant 4 heures, puis à zéro ensuite. Étant donné que les valeurs de paramètres de toutes les substances d'un même groupe étaient les mêmes dans cette simulation, les différences observées entre substances sont pour l'essentiel dues à la structure du réseau métabolique et aux effets d'interaction. Les concentrations veineuses à 4 heures (fin de l'exposition) vont de 0,25 à 0,45 mM/L (variation d'un facteur 1,8) pour le groupe *A*, et de 0,27 à 0,40 mM/L (un facteur 1,5) pour le groupe *B*. Après 24 heures, ces mêmes concentrations vont de 0,007 à 0,13 mM/L (un facteur 18) pour le groupe *A*, de 0,003 à 0,18 mM/L (un facteur 60) pour le groupe *B* et de 0,085 à 0,33mM/L (un facteur 4) pour le groupe *C*. On observe donc des différences substantielles entre produits. Le modèle global est capable de prédire la cinétique des composés parents et des métabolites dans n'importe quel organe et pour n'importe quel profil d'exposition. Une telle simulation ne prend qu'une fraction de seconde sur un processeur de type i686.

La Figure 7 donne les concentrations veineuses des substances des groupes *A* à *D*, 24 heures après le début de 4 heures d'exposition conjointe à un mélange de l'ensemble des substances des groupes *A*, *B* et *C*. On peut comparer ces concentrations à la somme des concentrations résultant d'expositions aux substances individuelles à la même dose. En l'absence d'interactions ces deux valeurs de concentration devraient être les mêmes pour chacune des substances. On constate que lors de l'exposition au mélange, les concentrations internes des substances des groupes *A*, *B*, et *C*, sont en général

augmentées (ce que nous qualifierons ici de "synergie"). Les métabolites du groupe *D* voient leurs concentrations réduites (ce que nous qualifierons "d'antagonisme").

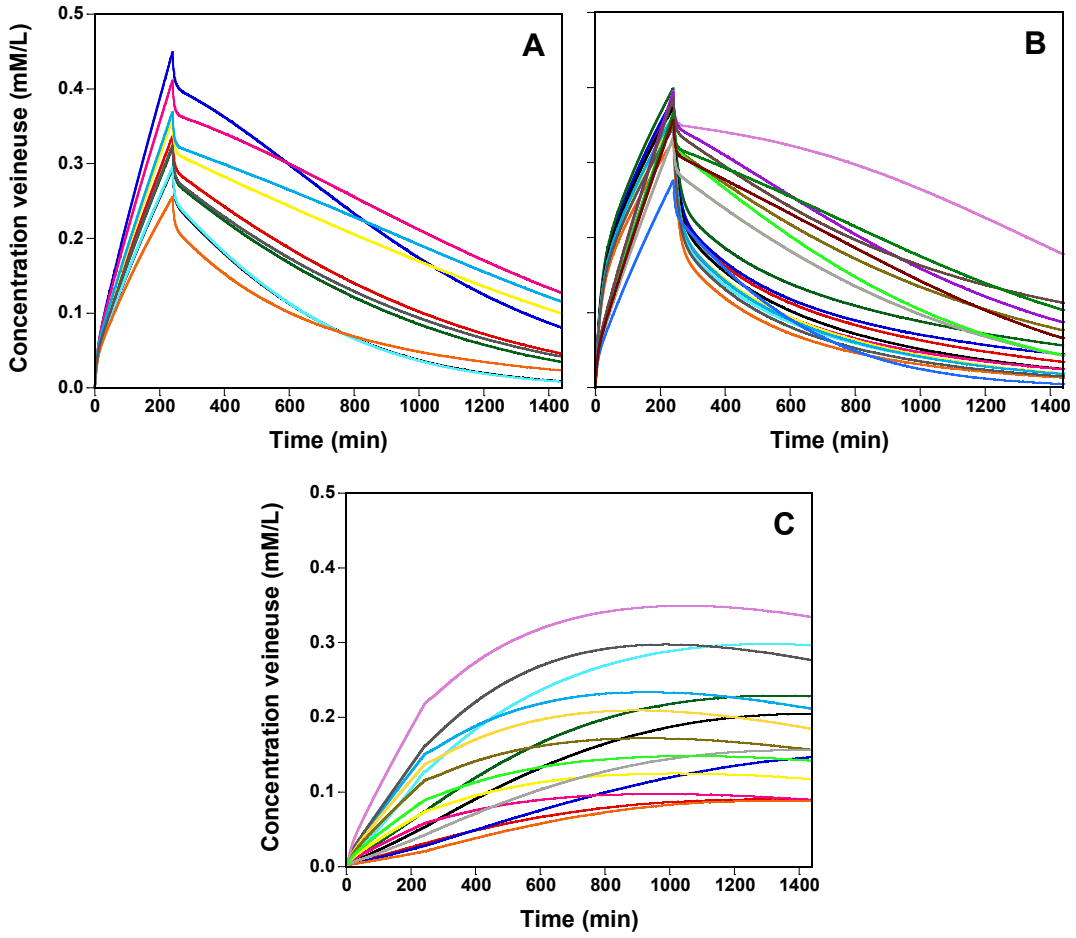


Figure 6 : Évolution temporelle de la concentration de chaque substance (6A : substances du groupe *A* ; 6B : groupes *B* et *C* ; 6C : groupe D) quand les substances sont administrées ensemble. Les différences entre profils sont dues pour tout ou partie aux interactions métaboliques.

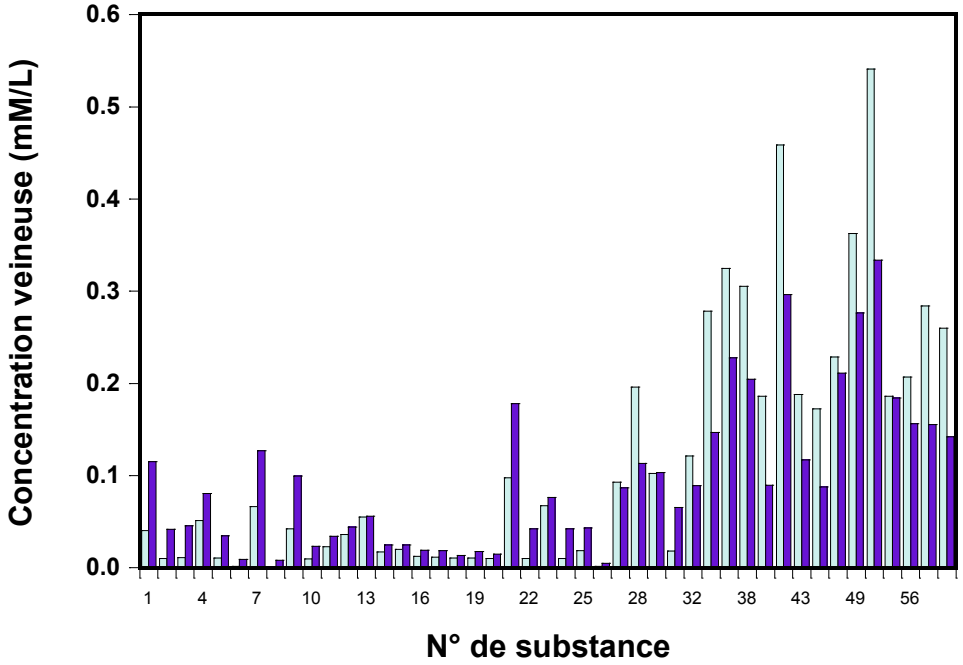


Figure 7 : Prédictions des concentrations veineuses des substances des groupes *A* à *D*, 24 heures après le début de 4 heures d'exposition conjointe à un mélange de l'ensemble des substances des groupes *A*, *B* et *C* (barres bleu foncé). Les barres claires donnent la valeur résultant de la somme des expositions aux substances individuelles, donc sans les interactions. Lors de l'exposition au mélange, les concentrations internes des substances des groupes *A*, *B*, et *C*, sont en général augmentées, alors que les métabolites du groupe *D* voient leurs concentrations réduites.

Une synergie (toxicité augmentée si la substance elle-même est toxique) est observée pour 60% des substances. L'augmentation de concentration à 24 h due, aux interactions, peut atteindre un facteur 7 fois (pour la substance S6). Les antagonismes (par inhibition de formation des métabolites) peuvent diminuer cette même concentration d'un facteur 2 (cas de la substance S39, métabolite de la substance S20).

Les résultats précédents ont été obtenus pour des doses d'exposition fortes. À des doses d'exposition dix fois (Figure 8) ou cent fois (Figure 9) plus faibles pour les substances des groupes *B* et *C*, les effets d'interaction s'atténuent. Les facteurs maximaux de synergie tombent à 2 (toujours pour S6) et ceux d'antagonisme à 1,5 (pour S59 et S38), mais les interactions avec les substances du groupe *A* (qui sont censées représenter des substrats naturels, ingérés à fortes doses) se font toujours sentir. Pour une même substance, le signe de l'interaction peut changer avec la dose. C'est le cas pour S23, S29, S41, et S46, dont on remarque que les trois premières ont de nombreux (voir Figure 5).

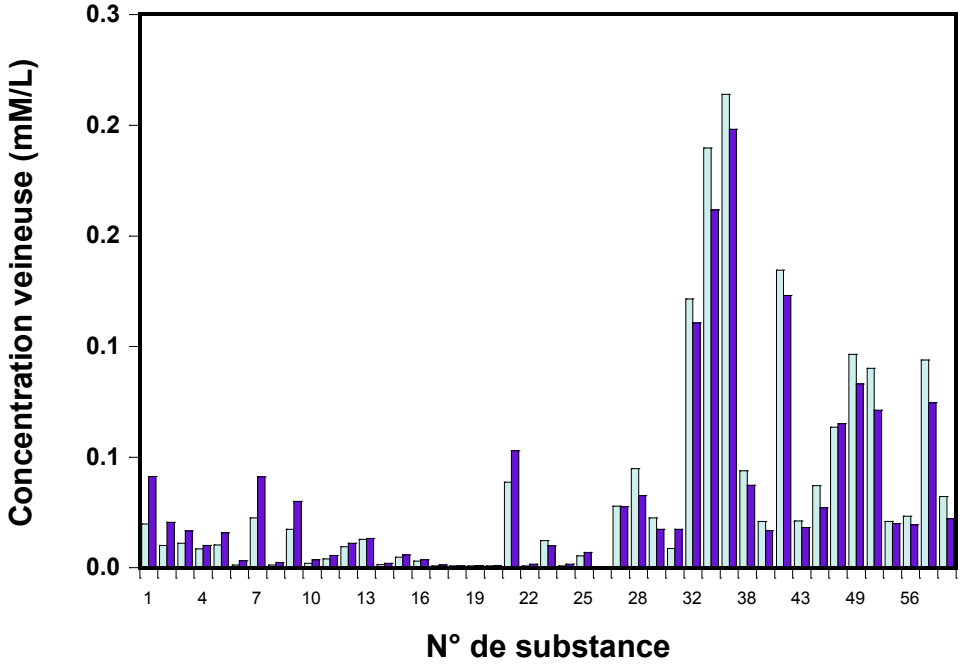


Figure 8 : Prédictions des concentrations veineuses des substances des groupes *A* à *D*, dans les mêmes conditions et avec la même légende que la Figure 7, à l'exception d'une diminution d'un facteur 10 de la dose d'exposition aux substances des groupes *B* et *C*.

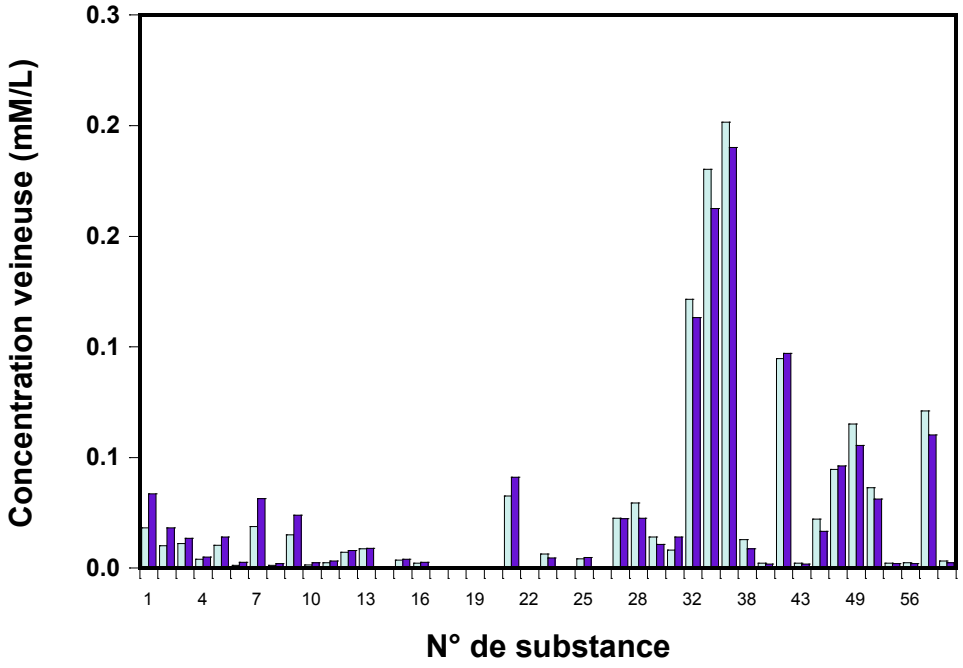


Figure 9 : Prédictions des concentrations veineuses des substances des groupes *A* à *D*, dans les mêmes conditions et avec la même légende que la Figure 7, à l'exception d'une diminution d'un facteur 100 de la dose d'exposition aux substances des groupes *B* et *C*.

Tout ceci a été obtenu avec un modèle dont les valeurs de paramètres étaient toutes fixées aux moyennes données dans les Tableaux 2 et 3. C'est un cas stylisé qui permet de mettre en évidence l'étendue possible des interactions et leur comportement. Dans la réalité, les paramètres caractérisant les substances vont être très différents et les doses d'exposition vont fluctuer. Pour simuler cette variabilité (qui se traduit pour nous par une incertitude sur la comportement exact d'un système réel), nous avons fait des simulations stochastiques (ou simulations Monte-Carlo), en tirant aléatoirement les valeurs des paramètres dans les distributions indiquées dans les Tableaux 2 et 3. Les concentrations aériennes des substances du groupe *B* ont été échantillonnées log-uniformément entre 10^{-6} et 10^{-1} mM, les taux d'ingestion des substances du groupe *A* uniformément entre 0,1 et 1, et ceux du groupe *C* log-uniformément entre 10^{-6} et 10^{-1} mM/min. L'analyse de 10000 simulations stochastique est assez complexe à illustrer, mais on peut par exemple étudier les corrélations entre les doses d'expositions aux substances des groupes *A* à *C* et les concentrations veineuses de chaque substances des groupes *A* à *D* (à un temps précis, comme la fin de la journée). Ces corrélations, quand elles existent sont dues soit à la filiation naturelle des substances ("corrélations directes": par exemple, S5 donne S16, qui donne S25 ; les concentrations internes S25 seront donc corrélées aux expositions à S5 et S16), soit aux interactions par compétition pour l'accès aux enzymes du métabolisme. Si l'on élimine les corrélations "directes" et les corrélations faibles (inférieures à 0,1 en valeur absolue) pour ne retenir que celles strictement induites par les interactions, on obtient la Figure 10. Celle-ci montre qu'un très petit nombre d'interactions (six) émerge de façon répétée et significative de la masse des possibles (*cf.* Figure 5). L'analyse des simulations stochastiques montre aussi, naturellement, que les paramètres pharmacocinétiques (en particulier les constantes d'élimination) interviennent de façon majeure dans le devenir des substances et des métabolites.

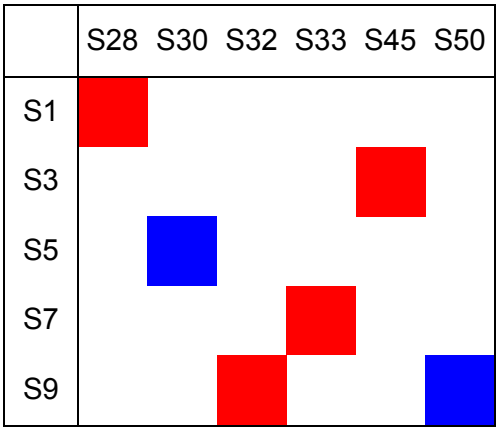


Figure 10 : Paires de substances interagissant significativement, compte-tenu de la variabilité et de l'incertitude sur les paramètres du mélange étudié. En rouge, corrélations négatives ; en bleu, positives. La lecture doit se faire de gauche à droite : par exemple, la dose de S1 influe indirectement sur la concentration veineuse de S28 (la réciproque n'est pas vraie).

Discussion

Face à la complexité de la question des mélanges de produits toxiques, très présents dans l'esprit du public et des spécialistes, il est nécessaire de développer de nouveaux outils et concepts. Notre approche profite d'avancées récentes en bioinformatique et biomathématiques pour tenter d'aboutir à une toxicologie prédictive des effets des mélanges complexes. Une approche similaire de la complexité est retrouvée en biologie systémique ou, expérimentalement, avec les méthodes "omiques" (Dix et al., 2007; Robertson, 2005; Westerhoff et al., 2009).

L'approche présentée ici a trois aspects principaux : recomposition automatique des réseaux métaboliques sur la base des réactions individuelles ; prise en compte automatique de la pharmacocinétique ; économie paramétrique grâce à une description fine des réactions métaboliques utilisant les "micro-constantes" de réaction (par opposition aux constantes de type Michaelis-Menten qui sont des combinaisons algébriques des précédentes). Le premier aspect tire avantage de la représentation précise et symbolique des réactions biochimiques en SBML, le second profite du développement de modèles pharmacocinétiques physiologiques génériques, le troisième est juste probablement une bonne idée.

Une des caractéristiques de notre approche est sa rapidité: Le développement du modèle PBPK patron a pris environ une heure et celle des modèles SBML trois heures (avec l'aide de JDesigner version 2.1c). La compilation de tous les modèles SBML avec le modèle PBPK a pris environ une seconde. Avec le modèle global, 10000 simulations stochastiques sont effectuées en 5 minutes et demie sur un processeur i686 sous GNU/Linux. L'analyse et l'interprétation des résultats prennent bien plus de temps…

Cependant, pour être pleinement opérationnelle, cette approche demande tout de même de rassembler des connaissances qualitatives et quantitatives sur le métabolisme individuel des substances d'intérêt, connaissances qui peuvent être lacunaires. Dans ce cas, le recours à l'expérimentation redevient utile, avec l'avantage qu'il est mieux ciblé et donc plus efficace. Une alternative à l'expérimentation, que nous explorons dans des projets en cours, est la détermination par modélisation quantique des micro-constantes de réactions (K_1, K_2 et K_3, Tableaux 2 et 3). La chimie quantique est une branche de la chimie théorique qui applique la mécanique quantique aux systèmes moléculaires pour étudier et éventuellement prédire leurs propriétés chimiques (et par extension biochimiques). La prédiction de réactions enzymatiques fait maintenant couramment appel à la chimie quantique. Le terme de "micro-constante" est utilisé en pharmacologie pour faire la distinction avec les constantes de type "Michaelis-Menten" qui sont des combinaisons algébriques des précédentes. Mais cette approche va demander validation, alors que seules sont disponibles, habituellement, les constantes michaeliennes (V_{max} et K_m).

Nous avons pris ici une approche théorique, faisant appel à des simulations stochastiques, pour explorer la méthode et ses capacités. Dans cette perspective, la création du réseau métabolique par simulation numérique est un avantage certain, puisqu'elle donne accès à la connaissance de sa vraie structure et des vraies valeurs des paramètres. Elle nous a permis d'utiliser des méthodes formelles pour la détermination des interdépendances entre substances, résultats qui ont à leur tour permis de valider les techniques numériques.

Ce couplage d'analyses théoriques et d'analyses numériques (simulations stochastiques *etc.*) nous a permis de générer un réseau métabolique relativement vraisemblable et de l'étudier en détail. Dans un tel réseau, les interactions potentielles sont monnaie courante. Le réseau étudié n'implique que 30 substances parentes, 10 enzymes et une ou deux réactions par substance, mais il est suffisamment dense pour autoriser l'interaction potentielle de chaque substance avec toutes les autres. En revanche, l'utilisation de valeurs réalistes pour les paramètres de cinétique et de métabolisme, en tenant compte de leur variabilité, a entraîné une forte réduction de l'impact (en prévalence et en amplitude) des interactions. Les phénomènes pharmacocinétiques (élimination rénale, affinité pour les graisses…) et bien sûr la dose d'exposition gardent toute leur importance dans la prédiction du devenir des substances.

Naturellement, le réseau métabolique étudié ici n'est qu'un exemple parmi beaucoup d'autres possibilités, et nous en sommes tributaires. Cet exercice est théorique, donc général, c'est son avantage, et les échelles des valeurs des paramètres (ou leurs unités) pourraient être changées conjointement et arbitrairement sans affecter les résultats obtenus. Il faut aussi noter que les échelles des valeurs des paramètres et des doses sont relatives l'une par rapport à l'autre. De plus, les résultats présentés ici sont moins intéressants en eux-mêmes que la méthode, mais une pure description mathématique et algorithmique de celle-ci serait bien aride, et nous avons choisi de l'illustrer.

Les classes de substances choisies (hormis les métabolites) sont arbitraires, et ne conditionnent pas l'applicabilité de la méthode à des cas réels. Notre groupe *A*, en particulier, représente simplement des substances de l'alimentation (naturelles, comme les phénols et les quinones, ou des additifs alimentaires comme les sorbates), présentes d'habitude à beaucoup plus fortes doses que les contaminants anthropogéniques. Ces substances sont probablement moins actives ou tout au moins mieux métabolisées que les autres, d'où leur importance pour une étude globale des interactions. Ceci est bien connu dans le cas des médicaments, mais peu de choses ont été faites à ce sujet jusqu'alors en dehors d'une approche par paires, comme exposé dans l'introduction. Les doses étudiées vont de faibles valeurs à de fortes valeurs (ces dernières étant peut-être peu souvent rencontrées, sauf pour des substances présentes dans l'alimentation naturelle), ce qui permet

montrer le contraste entre les deux situations. De la même façon les paramètres sont échantillonnés dans des plages arbitraires mais raisonnables.

Il est possible qu'un réseau réel réponde différemment, et ceci devra être étudié en détail par la suite. Il est par exemple aisé d'inclure les phénomènes d'induction enzymatique dans le réseau étudié (travail en cours) et l'ensemble des cascades de signalisation et de transcription peut être facilement intégré dans de tels modèles grâce à la notation SBML. Notons à ce propos que le logiciel *GNU MCSim* permet aussi de calibrer les paramètres du modèle global à l'aide d'outils d'inférence bayésienne (Bois, 2009).

Conclusions

La modélisation *ab initio* des interactions métaboliques entre substances en mélange est une voie faisable, et même prometteuse. Les calculs peuvent être effectués très rapidement et le développement du modèle est limité à celui d'un sous-modèle individuel par substance, réutilisable à chaque fois que cette substance est considérée dans un mélange. Bien sûr, l'établissement d'un schéma métabolique par substance prend du temps, mais il est négligeable par rapport à celui requis pour développer "manuellement" un modèle pour des dizaines de produits chimiques. L'approche présentée requiert des paramètres légèrement différents des constantes de Michaelis-Menten disponibles couramment, et son application à des cas concrets va demander un effort expérimental particulier, mais probablement rentable à moyen et long terme.

Finalement, ce travail pourrait être étendu à la description des interactions au niveau des cascades de signalisation ou de régulation, et donc à la modélisation des interactions pharmacodynamiques. La solution de problèmes biologiques complexes ne pourra se passer des mathématiques et de l'informatique, seules capables de réduire leur dimension. Notre travail ouvre, nous l'espérons, la voie à de nouvelles études théoriques et pratiques des interactions entre substances chimiques dans les mélanges complexes de notre environnement, ainsi qu'à la prédiction de leurs effets pour l'évaluation et la gestion des risques sanitaires.

Remerciements

Je remercie Karen Watanabe et Stefanie Stöckl pour des échanges productifs sur ces questions. Ce travail a été financé par la Commission Européenne, 6ème Programme Cadre, Priorité 6 (Changement Global et Écosystèmes), projet 2-FUN [contrat #036976] et par le Ministère de l'Environnement (BCRD 2004 DRC05).

Références

Barton H.A., Chiu W.A., R., Setzer W., Andersen M.E., Bailer A.J., Bois F., DeWoskin R.S., Hays S., Johanson G., Jones N., Loizou G., MacPhail R.C., Portier C.J., Spendiff M., Tan Y.-M., 2007, Characterizing Uncertainty and Variability in Physiologically-based Pharmacokinetic (PBPK) Models: State of the Science and Needs for Research and Implementation, Toxicological Sciences, 99: 395-402.

Bois F., 2003, Modélisation toxicocinétique de la concentration sanguine de 2,3,7,8-tétrachloro-p-dioxine après ingestion chez la femme, Environnement, Risque et Santé, 2:45-53.

Bois F., 2009, GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models, Bioinformatics, doi: 10.1093/bioinformatics/btp162.

Bois F., Gravil P.J., Vasseur P., Isoard P., 1988, Optimal pollution control strategies in the presence of interacting toxicants, Water Research, 22:1443-1447.

Bois F., Maszle D., 1997, MCSim: A simulation program, Journal of Statistical Software, 2(9): http://www.stat.ucla.edu/journals/jss/v02/i09.

Bois F., Paxman D., 1992, An analysis of exposure rate effects for benzene usant a physiologically based pharmacokinetic model, Regulatory Toxicology et Pharmacology, 15:122-136.

Bois F., Vaillant M., Vasseur P., 1986, Multiple regression analysis of toxic interactions: Application to the Microtox test and general comments, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36:707-714.

Bouvier d'Yvoire M., Prieto P., Blaauboer B.J., Bois F., Boobis A., Brochot C., Coecke S., Freidig A., Gundert-Remy U., Hartung T., Jacobs M. N., Lavé T., Leahy D.E., Lennernäs H., Loizou G.D., Meek B., Pease C., Rowland M., Spendiff M., Yang J., Zeilmaker M., 2007, Physiologically-based kinetic modelling (PBK modelling): meeting the 3Rs agenda - The report and recommendations of ECVAM Workshop 63a, Alternatives to Laboratory Animals, 35:661-671.

Demin O., Goryanin I., 2009, Kinetic Modelling in Systems Biology, Chapman & Hall / CRC Mathematical and Computational Biology Series, 332 p.

Dix D.J., Houck K.A., *et al.*, 2007, The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals, Toxicological Sciences 95:5-12.

Haddad S., Tardif R., Charest-Tardif G. and Krishnan K., 1999, Physiological modeling of the toxicokinetic interac-tions in a quaternary mixture of aromatic hydrocarbons. Toxicology and Applied Pharmacology, 161:249-257.

Hucka, M. *et al.*, 2003, The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. Bioinformatics, 19:524-531.

Loizou G., Spendiff M., Barton H.A. , Bessems J., Bois F., Bouvier d'Yvoire M., Buist H., Clewell H.J.III, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W., 2008, Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 50:400-411.

Michaelis L., Menten M. L., 1913, Die kinetik der invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift 49:333-369.

Micallef S., Brochot C., Bois F., 2005, L'analyse statistique bayésienne de données toxicocinétiques, Environnement, Risque et Santé, 4:21-34.

Robertson D.G., 2005, Metabonomics in toxicology: a review. Toxicological Sciences 85:809-822.

Westerhoff, H. V., Kolodkin, A. et al., 2009, Systems biology towards life in silico: mathematics of the control of living cells. Journal of Mathematical Biology 58: 7-34.

Woodruff T.J., Bois F., 1993, Optimization issues in physiological toxicokinetic modeling: A case study with benzene, Toxicology Letters, 69:181-196.