

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2018

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 26 Octobre 2018 à POITIERS
par Monsieur Vincent ARANZANA-CLIMENT
né le 17 Mai 1993

Modélisation pharmacodynamique de l'effet de la colistine sur *Pseudomonas aeruginosa*: extrapolation *in vitro-in vivo*

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur William COUET

Membres : Docteur Nicolas GREGOIRE, Maître de conférences
Monsieur Marc CEROU, Ingénieur de l'INSA de Lyon

Directeur de thèse : Docteur Nicolas GREGOIRE

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2018

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 26 Octobre 2018 à POITIERS
par Monsieur Vincent ARANZANA-CLIMENT
né le 17 Mai 1993

Modélisation pharmacodynamique de l'effet de la colistine sur *Pseudomonas aeruginosa*: extrapolation *in vitro-in vivo*

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur William COUET

Membres : Docteur Nicolas GREGOIRE, Maître de conférences
Monsieur Marc CEROU, Ingénieur de l'INSA de Lyon

Directeur de thèse : Docteur Nicolas GREGOIRE



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie (HDR)
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

« En pharmacie il y a toujours un moment où l'on sait des trucs mais ça ne dure pas longtemps »

Proverbe ardennais

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur William COUET qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse, après m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire il y a maintenant 5 ans (déjà!) et me permettre d'y faire ma thèse d'Université. En espérant transformer l'essai l'année prochaine!

Merci à Monsieur Marc CEROU d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse, l'amitié que Yacine et toi m'avez offerte a marqué mon Master 2 et j'espère qu'elle perdurera de longues années encore.

Merci infiniment au Docteur Nicolas GREGOIRE d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse ainsi que mon co-directeur de thèse pour la thèse d'Université. Mais aussi, d'avoir accepté en stage de découverte un petit PH3 et de l'avoir accompagné dans ses pérégrinations pharmacométriques depuis. Merci enfin, pour ta disponibilité et ta patience, face à mes questionnements aussi fréquents qu'intempestifs. Bonne escapade sud-américaine, reviens nous vite que l'on puisse fêter ça dignement!

Merci aux copains de promo pour ces 6 années studieuses (?), Louissette (championne d'extraction liquide-liquide et accessoirement de judo), Maxime (allez les Chamois!), Dorothea (der Königin der Bäume) et Valentin (le Batman hospitalier).

Merci aux copains de l'U1070 Jean-Michel Pig (Alexis), Jean-Michel PBPK (Romain), Mumu la terrible, Alexia la pignappeuse, Bruna la tombeuse venue du Sud, Julien le rockeur venu du Nord et tous les autres...

Merci aux copains corpo/PLB/tracteur-tondeuse, Laurent (this is for you 33700), Julie (promis plus les pieds sur la table!), Camille (tu veux des vis?), Thomas (on est champions!), Mimi (docteur ès Moscato), Diane (de Poitiers), Fanny (Jag pratar inte svenska!), P-E (quand est-ce que tu rends Matignon?).

Many thanks to Ileana, my teacher/director/sister from another mother the last few years would have been waaaay less funny had not we met! And make no mistake, your flight is hopeless, I'll come find thee!

Another big thank you to Katie, I am still amazed (and know not what to say?) by how you were able to disregard all preconceived ideas and offered me your friendship. It is really precious to me, thank you.

Merci à Romain, mon frère, de m'avoir fait l'honneur d'assister à cette thèse. Sache, que malgré nos différences je suis et serais toujours là pour toi.

Merci à vous, Papa et Maman, cette thèse c'est aussi un peu la votre tant vous m'avez et continuez de m'apporter. J'espère bien vous le rendre, et je vous prie de bien vouloir croire en mon éternelle gratitude.

Je tiens aussi a remercier l'article 302 du code Pénal sans qui, d'après une source anonyme, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Cependant, nous pouvons aussi conjecturer que la force de caractère de cet anonyme soit plus méritante que quelques mots inscrits dans un livre rouge.

Merci à mon Dragon, qui a défaut de cracher du feu donne un côté fantastique à ma vie.

Table des matières

Remerciements	v
1 Introduction	1
2 Matériel et Méthodes	3
2.1 Expériences	3
2.1.1 Souche bactérienne	3
2.1.2 Préparation de l'antibiotique	3
2.1.3 Time-kill curve <i>in vitro</i>	3
2.1.4 Time-kill curve <i>in vivo</i>	4
2.1.5 Données pharmacocinétiques <i>in vivo</i>	4
2.1.6 Données pharmacodynamiques <i>in vivo</i>	5
2.2 Modélisation mathématique	6
2.2.1 Modèles pharmacodynamiques <i>in vitro</i>	6
Modèles de croissance bactérienne	6
Modèles d'effet antibiotique	7
Modèles de résistance à l'antibiotique	8
Variabilité inter-individuelle	11
Variabilité résiduelle	11
2.2.2 Modèles pharmacocinétiques <i>in vivo</i>	11
Variabilité inter-individuelle	12
Variabilité résiduelle	12
2.3 Analyse d'identifiabilité des modèles	13
2.4 Validation et sélection des modèles	13
2.4.1 Graphiques d'adéquation du modèle aux données et erreur d'estimation des paramètres	13
2.4.2 NPDE	14
2.4.3 Critères statistiques	14
2.4.4 Vérifications prédictives visuelles (VPC)	14
2.4.5 Précision d'estimation des paramètres du modèle final	14
2.5 Simulations de profils pharmacodynamiques <i>in vivo</i>	15
2.6 Logiciels et algorithmes	16
3 Résultats	17
3.1 Identifiabilité	17
3.2 Time-kill curve <i>in vitro</i>	17
3.3 Modèles pharmacodynamiques <i>in vitro</i>	19
3.4 Données pharmacocinétiques <i>in vivo</i>	24
3.5 Modèles pharmacocinétiques <i>in vivo</i>	25

3.6	Time-kill curve <i>in vivo</i>	28
3.7	Estimation des paramètres de croissance bactérienne <i>in vivo</i>	30
3.8	Simulations	31
4	Discussion	32
5	Conclusion	35
A	Analyse d’identifiabilité structurelle du modèle <i>in vitro</i> final	36
A.1	Code C++ du modèle	36
A.2	Code R pour l’analyse	37
B	Modèle PD <i>in vitro</i> final	41
B.1	Code NONMEM du modèle	41
C	Modèle PK <i>in vivo</i> final	44
C.1	Code NONMEM du modèle	44
D	Analyse d’identifiabilité structurelle du modèle <i>in vitro</i> final	47
D.1	Code C++ du modèle	47
D.2	Code R pour simuler et tracer les graphiques	48
	Bibliographie	50
	Résumé	54

Liste des figures

2.1	Bactéries persistantes	6
2.2	Croissance logistique	7
2.3	Modèle bactéries persistantes avec effet de la colistine	8
2.4	Modèle d'adaptation bactérienne, bactéries persistantes	9
2.5	Modèle d'hétérorésistance bactérienne, croissance logistique	10
2.6	Modèle PK <i>in vivo</i>	12
3.1	Analyse de l'identifiabilité du modèle PD <i>in vitro</i> final	17
3.2	Time-kill curves <i>in vitro</i>	18
3.3	NPDE du modèle PD <i>in vitro</i> final	21
3.4	Distiribution des NPDE du modèle PD <i>in vitro</i> final	21
3.5	VPCs du modèle PD <i>in vitro</i> final	23
3.6	Colistinémie <i>in vivo</i>	24
3.7	NPDE du modèle PK <i>in vivo</i> final	27
3.8	VPCs du modèle PK <i>in vivo</i> final	28
3.9	"Time-kill curve <i>in vivo</i> "	29
3.10	Prédictions typiques du modèle PK/PD combiné	31

Liste des tableaux

3.1	Paramètres du modèle PD <i>in vitro</i> final	20
3.2	Tests sur les NPDE du modèle PD <i>in vitro</i> final	21
3.3	Paramètres du modèle PK <i>in vivo</i> final	26
3.4	Tests sur les NPDE du modèle PD <i>in vitro</i> final	27
3.5	Paramètres de croissance bactérienne du modèle PD <i>in vivo</i> final	30

Liste des abréviations

CMI	Concentration minimale inhibitrice
IR	Ratio d'importance
LOQ	Limite de quantification
MHA-CA	Gélose Mueller Hinton ajustée en cations
MHB-CA	Bouillon Mueller Hinton ajusté en cations
NPDE	Erreurs de prédictions normalisées
OFV	Valeur de fonction objective
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>p. ex.</i>	Par exemple
PD	Pharmacodynamie
PK	Pharmacocinétique
RSE	Erreur-type résiduelle
UFC	Unité formant colonie
VPC	Vérification visuelle prédictive

Chapitre 1

Introduction

La colistine est un antibiotique composé de plusieurs peptides, les principaux étant la colistine A et la colistine B. Elle a été mise sur le marché dans les années 50, mais retirée dans les années 70 à cause de sa toxicité, rénale en particulier. Récemment, on a pu observer une résurgence de la colistine, en tant qu'antibiotique de la dernière chance contre les bactéries à Gram négatif multi-résistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* [1, 2]. *P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif et l'une des principales espèces responsables d'infections nosocomiales à travers le monde [3]. Elle est connue pour sa résistance intrinsèque vis à vis de nombreux antibiotiques [4], mais est aussi capable de développer une résistance contre des antibiotiques auxquels elle était sensible initialement [5]. Toutes ces caractéristiques font de la lutte contre *P. aeruginosa* un problème clinique important.

La modélisation mathématique est un outil important et très utile pour l'analyse pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) des molécules antibactériennes [6]. Il a été montré que la modélisation mécanistique des résistances bactériennes était importante pour prédire correctement la mort bactérienne [7]. Il a aussi été montré que *P. aeruginosa* pouvait présenter différents types de résistances à la colistine, une hétérorésistance ou bien une résistance dite adaptative. Les souches hétérorésistantes sont composées de multiples sous-populations ayant chacune une sensibilité propre à l'antibiotique, il faut noter que le phénomène a été aussi observé chez des souches considérées comme sensibles [8]. Pour décrire une telle hétérorésistance, un modèle pharmacodynamique (PD) a été développé par Bulitta et al. [9]. Au cours d'une étude de Lee et al. [10], il a été montré que *P. aeruginosa* était aussi capable de développer une résistance dite adaptative vis à vis de la colistine. Résistance adaptative désigne un processus suivant lequel une population bactérienne initialement sensible à l'antibiotique y devient résistante. Mohammed et al. [11] ont développé un modèle PD comprenant de la résistance adaptative

La modélisation mathématique mécanistique est un outil approprié pour extrapoler, par exemple, en se basant sur des résultats *in vitro* et un modèle développé à partir de ceux-ci il est possible de prédire des résultats attendus *in vivo* [12]. Dans une étude, Mohamed et al. ont développé un modèle

PK/PD en combinant un modèle PD développé à partir de données *in vitro* et un modèle PK développé à partir de données provenant d'une étude sur des patients de réanimation. Ensuite, ils ont utilisé ce modèle PK/PD combiné pour simuler des courbes de densité bactériennes attendues chez le patient de réanimation, et ce pour différents schémas d'administration de colistine [13]. Plusieurs hypothèses sont faites lors de ces simulations : 1. l'effet de la colistine est dépendant de sa concentration plasmatique libre (non liée aux protéines plasmatique) 2. La fraction libre (fu) de colistine varie avec la concentration plasmatique totale en colistine 3. Aucune réponse physiologique à l'infection (*p.ex.* la réponse immunitaire) n'influe sur la densité bactérienne. Boisson et al. ont aussi utilisé un modèle PD *in vitro* pour simuler des courbes de densité bactérienne *in vivo* [14]. Une faiblesse partagées par ces deux articles est l'absence de données *in vivo* pour valider les simulations.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Expériences

2.1.1 Souche bactérienne

Une souche de *P. aeruginosa* ATCC27853 (Concentration minimale inhibitrice de colistine = 0.5 mg/L) a été fournie par le service de bactériologie du CHU de Poitiers. Elle a été conservée à -80°C. Avant chaque expérience, la souche a été mise en culture sur gélose Mueller Hinton ajustée en cation (MHA-CA) (Biomérieux, France) à 37°C pendant une nuit.

2.1.2 Préparation de l'antibiotique

L'antibiotique utilisé a été le sulfate de colistine en poudre (Sigma, France). La molécule a été mise en solution dans de l'eau stérile avant chaque utilisation et ajustée à une concentration de 80 mg/L.

2.1.3 Time-kill curve *in vitro*

Une solution bactérienne concentrée à 1×10^8 Unités Formant Colonies/mL (UFC/mL) a été préparée à partir d'une culture bactérienne sur gélose en suspendant quelques colonies dans du bouillon Mueller Hinton ajusté en cation (MHB-CA) puis ajustée à une densité optique de 0.1 une longueur d'onde de 600 nm, lue par un spectrophotomètre (Biochrom, Royaume-Uni). Sept tubes de culture ont été préparés afin d'obtenir des solutions de colistine dans le MHB-CA concentrées à 8, 4, 2, 1,0.5, 0.25 et 0 mg/L. Afin de minimiser la perte de colistine par fixation non spécifique, les tubes ont été préparés par des dilutions incrémentielles et non sérielles comme préconisé par Karavanen et al. [15]. Ensuite, la solution bactérienne a été ajoutée à chacun des tubes de culture, en réalisant une dilution au 1/100e de la solution bactérienne concentrée à 1×10^8 UFC/mL, afin d'obtenir un inoculum de départ concentré à 1×10^6 UFC/mL. Les tubes de culture ont été mis en culture à 37°C. Des échantillons ont été prélevés 0, 3, 8, 13, 20 et 24h après l'ajout des bactéries. Ils ont été dilués puisensemencés sur des géloses MHA-CA en utilisant le système Spiral (Interscience, France). Après ensemencement, les

géluses ont été incubées à 37°C pendant 24h puis lues en utilisant un compteur de colonies automatique (Interscience, France). La limite de quantification (LOQ) était de 200 UFC/mL. L'expérience a été répétée 3 fois pour les concentrations <1 mg/L et 4 fois pour les concentrations ≥ 1 , afin d'évaluer la variabilité des résultats.

2.1.4 Time-kill curve *in vivo*

Les expériences ont été réalisées dans un isolateur connecté par un sas de transfert à un poste de sécurité microbiologique (Thermo, Allemagne). Cette mesure avait pour but d'éviter les contaminations et de protéger les expérimentateurs contre tout risque infectieux ou cytotoxique. Des souris « Swiss » mâles, pesant 23 à 25 g, et âgées de 6 semaines, ont été utilisées (Janvier, France). Elles ont été nourries par de l'eau stérile et des aliments solides à volonté pendant la durée de chaque expérience. Un total de 187 souris a été nécessaire pour obtenir les données expérimentales retenues pour l'analyse. L'immunosuppression a été induite par injection sous-cutanée de 150 mg/kg, puis 100 mg/kg de cyclophosphamide (Baxter, Allemagne), respectivement 4 jours et 1 jour avant l'infection, provoquant une déplétion majeure en polynucléaires neutrophiles pendant 5 jours [16, 17]. L'inoculum bactérien a été préparé à l'aide d'un néphélomètre (Biomérieux, France) pour obtenir une suspension à 1.5×10^7 UFC/mL de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Trois heures avant le traitement antibiotique, les souris ont été anesthésiées. L'anesthésie a été pratiquée, pour une durée de 5 minutes environ, par injection intramusculaire dans la cuisse droite d'une solution (volume de 0,15 mL) associant xylazine, kétamine (Bayer Health Care, France) et sérum physiologique (1/2/12, vol/vol/vol). Une fois endormies, 50 μ L d'inoculum bactérien ont été instillés à l'entrée des fosses nasales, en position verticale et sans reposer la souris dans sa cage avant de s'être assuré que plus aucune bulle ne se formait sur leur museau. Trois heures après avoir été infectées, les souris ont reçu une dose unique de 10, 20 ou 30 mg/kg de colistine par voie sous-cutanée, ou de soluté salé isotonique pour les souris contrôles (volume de 0,5 mL). Des groupes de souris traitées et contrôles ont été sacrifiés, après un délai variable de 0 à 28 heures après l'injection d'antibiotique, et à raison de 5 souris par dose et par temps. Pour 118 souris sur un total de 187, un échantillon de sang d'un mL environ a été prélevé sous anesthésie avant le sacrifice.

2.1.5 Données pharmacocinétiques *in vivo*

Chaque prélèvement sanguin a été réalisé par ponction cardiaque percutanée, et déposé dans des micro-tubes héparinés de 1,5 mL. Le plasma a été séparé par centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours par minute, et rapidement conditionné dans des tubes individuels en position verticale à -20 °C dans l'attente des dosages. Les dosages plasmatiques de colistine ont été réalisés par une méthode validée de chromatographie en phase liquide

haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Pour les dosages, les échantillons plasmatiques ont été décongelés, homogénéisés et centrifugés à 2500 tours par minute pendant 10 minutes. Ensuite, le plasma a été purifié sur une cartouche d'extraction de type OASIS HLB (Waters, Etats-Unis). L'appareil utilisé était un système chromatographique Waters Alliance Separations module 2695 (pompe binaire, injecteur thermostaté), couplé à un détecteur Micromass® Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters), et au logiciel Masslynx® version 4.0. La colonne de chromatographie utilisée était de type C18 Xbridge® de 150 × 4 mm, diamètre des particules 5 µm (Waters). La méthode LC-MS/MS employée consistait à quantifier les composés A et B de la colistine ainsi que l'étalon interne (polymyxine B) par ionisation en mode electrospray positif avec détection des transitions de masse m/z 585,5/101,2 pour la colistine A, 578,5/101,2 pour la colistine B et 602,5/241,2 pour la polymyxine B. La phase mobile était un mélange à 75/25 (v/v) d'acide formique à 0,1 % dans de l'acétonitrile et d'acide formique à 0,1 % dans de l'eau. La limite de quantification a été de 0,048 mg/L pour la colistine A et de 0,030 mg/L pour la colistine B. Sept points de gamme ont été utilisés pour couvrir l'étendue de gamme de concentrations attendues dans les échantillons. Le biais maximum autorisé était fixé à plus ou moins 20 % pour la limite de quantification et à 15 % pour les autres points de gamme. Six échantillons de contrôle qualité, correspondant à 3 concentrations différentes, ont été inclus dans chaque série de dosage. La concentration de colistine totale correspondait à la somme des concentrations de colistine A et B.

2.1.6 Données pharmacodynamiques *in vivo*

Dès le prélèvement sanguin réalisé, les souris ont été sacrifiées par dislocation crânio-cervicale. Les poumons ont ensuite été prélevés stérilement par voie dorsale, avant d'être pesés, puis homogénéisés dans 2 mL de soluté salé isotonique à l'aide d'un Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Allemagne) tournant à 10000 tours par minute. Des dilutions sérielles au 1/10e de chaque broyat ont été ensemencées sur gélose MHA-CA, à raison de 10 µL par quart de boîte et d'une boîte par dilution. La charge bactérienne pulmonaire totale a été déterminée pour chaque souris après incubation à 37°C pendant 18 h, par comptage des UFC visibles sur les géloses. Pour chaque expérience, des comptages bactériens ont été réalisés chez des souris contrôles au moment de l'injection d'antibiotique, et à un ou plusieurs temps prédéfinis. Pour chaque échantillon les UFC/mL d'homogénat ont été convertis en UFC/mg de poumon en suivant la formule suivante :

$$UFC/mg = \frac{UFC/mL \times 2mL}{Poids_{homogénat}(mg)} \quad (2.1)$$

Le volume occupé par le poumon dans l'homogénat a été considéré comme négligeable. La limite de quantification était de 37.5 UFC/mg d'homogénat

2.2 Modélisation mathématique

2.2.1 Modèles pharmacodynamiques *in vitro*

Un modèle décrivant la PD *in vitro* d'un antibiotique peut se diviser en trois composantes, le modèle de croissance bactérienne, le modèle d'effet antibiotique et le modèle de résistance bactérienne. Pour chacune de ces composantes, de multiples alternatives sont envisageables. Elles peuvent différer d'un point de vue purement mathématique, p.ex. différentes paramétrisations d'un modèle d'effet. Mais encore d'un point de vue mécanistique, où des modèles capables de rendre compte des même résultats expérimentaux (même profils de densité bactérienne), peuvent avoir des implications mécanistiques très différentes, p.ex. modèle de résistance bactérienne adaptative *versus* modèle d'hétérorésistance bactérienne. Dans ce travail, nous avons pour chacune des composantes du modèle, testé plusieurs alternatives, toutes présentées ci-après.

Modèles de croissance bactérienne

Lors d'une expérience de time-kill curve, les bactéries non traitées, entrent dans une phase de croissance exponentielle jusqu'à atteindre, un plateau et leur nombre se stabilise tant qu'il y a assez de nutriments dans le milieu. Deux modèles mathématiques ont été testés et permettent de décrire ce phénomène.

Un premier modèle, proposé par [18] en se basant sur les travaux de [19] intègre un passage des bactéries vers une état non croissant, dit persistant, lorsque la population bactérienne atteint une taille critique. Voir figure 2.1

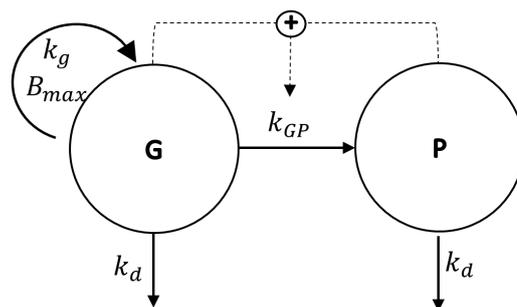


FIGURE 2.1 – Bactéries persistantes

L'évolution de la densité des bactéries croissantes (G) et persistantes (P) est donnée par les équations différentielles 2.2 et 2.3 respectivement.

$$\frac{dG}{dt} = k_g \times G - k_d \times G - k_{GP} \times G \quad (2.2)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_{GP} \times G - k_d \times P \quad (2.3)$$

Où k_g est la constante de vitesse de croissance (en h^{-1}), et k_d la constante de vitesse de mort (en h^{-1}), et $k_{GP} = \frac{G+P}{B_{max}} \times (k_g - k_d)$ la constante de vitesse de transfert vers l'état persistant (en h^{-1}), avec B_{max} la densité bactérienne maximale du système (en UFC/mL). Le transfert de l'état persistant vers l'état croissant est supposé nul compte tenu de nos conditions expérimentales (pas de phase de décroissance attendue après une phase de plateau). Au début de l'expérience, toutes les bactéries sont supposées croissantes, i.e. :

$$t = 0 \begin{cases} G = \text{Inoculum} \\ P = 0 \end{cases}$$

Un second modèle dit de croissance logistique, d'abord proposé par [20] intègre une fonction logistique dans l'équation pour décrire la croissance bactérienne ainsi que la phase de plateau. Voir figure 2.2

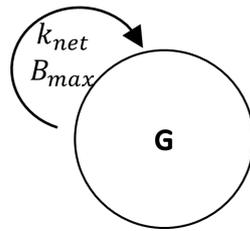


FIGURE 2.2 – Croissance logistique

L'évolution du nombre de bactéries croissantes (G) est donnée par l'équation différentielle 2.4.

$$\frac{dG}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{G}{B_{max}}\right) \times G \quad (2.4)$$

Où $k_{net} = k_g - k_d$ est la constante de vitesse de croissance apparente (en h^{-1}) et k_g, k_d, B_{max} comme définis précédemment.

Modèles d'effet antibiotique

Ensuite, il fallait que le modèle intègre une fonction décrivant l'effet antibiotique de la colistine. Quel que soit le modèle de croissance bactérienne choisi, la molécule devra agir sur les bactéries croissantes, les persistantes étant supposées insensibles à l'antibiotique. La figure 2.3 et l'équation associée 2.5 représentent l'ajout du modèle d'effet à un modèle de croissance bactérienne avec bactéries persistantes.

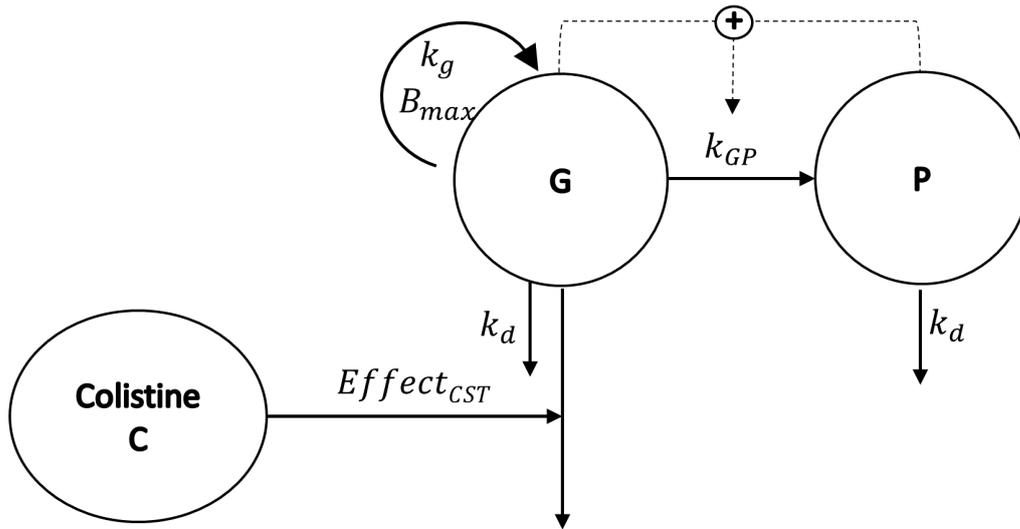


FIGURE 2.3 – Modèle bactéries persistantes avec effet de la colistine

$$\frac{dG}{dt} = k_g \times G - k_d \times G - k_{GP} \times G - Effet_{CST} \times G \quad (2.5)$$

L'effet antibactérien ($Effet_{CST}$) est caractérisé par une fonction mathématique dépendant de la concentration en colistine dans le système. Dans ce travail, 4 fonctions d'effet ont été testées :

$$Effet_{CST} = \frac{E_{max} \times C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (2.6)$$

$$Effet_{CST} = \frac{E_{max} \times C}{EC_{50} + C} \quad (2.7)$$

$$Effet_{CST} = E_{slope} \times C^\gamma \quad (2.8)$$

$$Effet_{CST} = E_{slope} \times C \quad (2.9)$$

Où C est la concentration en colistine présente dans le système (en mg/L), E_{max} est la constante de vitesse de bactéricidie maximale atteignable par la colistine (en h^{-1}), EC_{50} est la concentration en colistine produisant 50% d' E_{max} (en mg/L), γ est un facteur de sigmoïdité (équation 2.6) ou de puissance (équation 2.8) et E_{slope} la pente de la vitesse de bactéricidie (en $L/mg/h$)

Modèles de résistance à l'antibiotique

En se basant sur les résultats obtenus lors d'expérience similaires [11] nous avons constaté qu'en présence de certaines concentrations de colistine, une repousse était observée après quelques heures. Notre modèle devait donc être capable de décrire un tel phénomène. Pour ce faire deux hypothèses sur les raisons de la repousse peuvent être émises et donc deux types de modèles ont été testés.

Première hypothèse, la repousse pouvait être due à une adaptation des bactéries, i.e. lorsque de la colistine est présente dans le milieu, les bactéries sur-expriment des gènes de résistance à la colistine, diminuant son efficacité. Une représentation schématique de ce modèle est donnée par la figure 2.4 et les équations 2.10, 2.11, 2.12 le caractérisent.

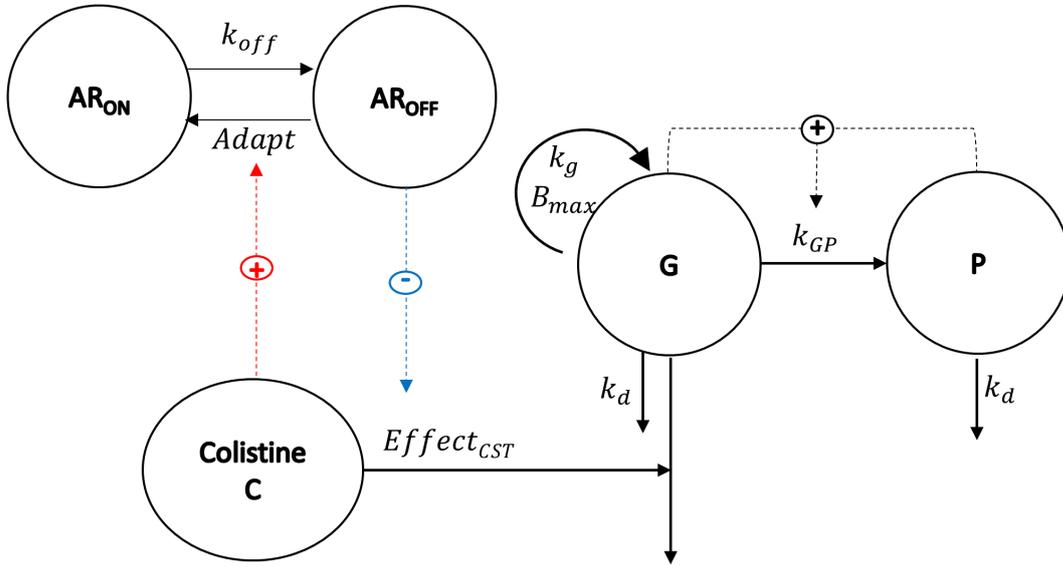


FIGURE 2.4 – Modèle d'adaptation bactérienne, bactéries persistantes

$$\frac{dG}{dt} = k_g \times G - k_d \times G - k_{GP} \times G - Effet_{CST} \times (1 - AR_{ON}^{\beta}) \times G \quad (2.10)$$

$$\frac{dAR_{ON}}{dt} = Adapt \times AR_{OFF} - k_{off} \times AR_{ON} \quad (2.11)$$

$$\frac{dAR_{OFF}}{dt} = k_{off} \times AR_{ON} - Adapt \times AR_{OFF} \quad (2.12)$$

Où AR_{ON} et AR_{OFF} représentent une quantité virtuelle de résistance adaptative ou son absence, respectivement. β est un paramètre puissance modulant la réduction d'efficacité de la colistine dû à l'adaptation. $Adapt$ et k_{off} sont les constantes de vitesse de développement ou de réversion de la résistance adaptative (en h^{-1}), respectivement. À l'instar d' $Effet_{CST}$, $Adapt$ est une fonction dépendante de la concentration en colistine dans le système, et 4 fonctions différentes ont été évaluées :

$$Adapt = \frac{k_{onmax} \times C^{\delta}}{C_{on50}^{\delta} + C^{\delta}} \quad (2.13)$$

$$Adapt = \frac{k_{onmax} \times C}{C_{on50} + C} \quad (2.14)$$

$$Adapt = k_{onslope} \times C^\delta \quad (2.15)$$

$$Adapt = k_{onslope} \times C \quad (2.16)$$

Où C était la concentration en colistine présente dans le système (en mg/L), k_{onmax} était la constante de vitesse d'adaptation maximale atteignable en présence de colistine (en h^{-1}), C_{on50} était la concentration en colistine produisant 50% de k_{onmax} (en mg/L), δ était un facteur de sigmoïdité (équation 2.13) ou de puissance (équation 2.15) et $k_{onslope}$ la pente de la vitesse d'adaptation (en $L/mg/h$). Avec ce modèle il était supposé que toutes les bactéries étaient à l'état non adapté au début de l'expérience, i.e. :

$$t = 0 \begin{cases} AR_{ON} = 0 \\ AR_{OFF} = 1 \end{cases}$$

Hypothèse alternative, la repousse pourrait être due à une hétérogénéité de la population bactérienne étudiée, i.e. une faible fraction de l'inoculum est constitué de bactéries résistantes à la colistine. En présence d'une concentration intermédiaire de colistine, les bactéries sensibles mourraient mais les bactéries résistantes proliféreraient. Une représentation schématique de ce modèle est donnée par la figure 2.5 et les équations 2.17 et 2.18 le caractérisent.

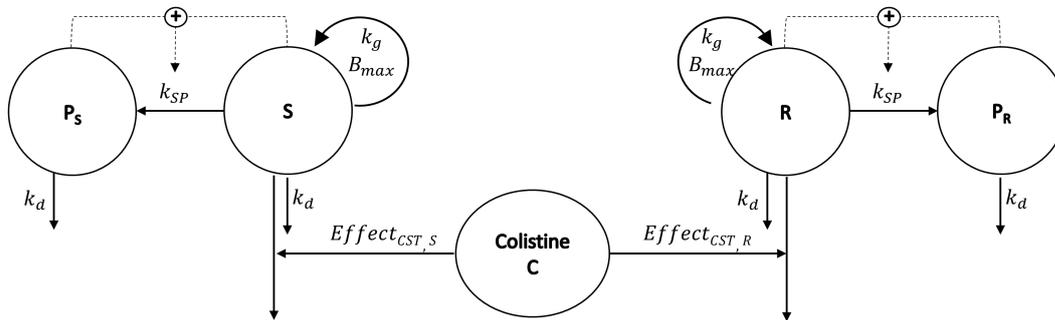


FIGURE 2.5 – Modèle d'hétérorésistance bactérienne, croissance logistique

$$\frac{dS}{dt} = k_g \times S - k_d \times S - k_{SP} \times S - Effet_{CST-S} \times S \quad (2.17)$$

$$\frac{dR}{dt} = k_g \times R - k_d \times R - k_{SP} \times R - Effet_{CST-R} \times R \quad (2.18)$$

Où S et R étaient les densités en bactéries sensibles et résistantes (en UFC/mL), respectivement. $Effet_{CST-S}$ et $Effet_{CST-R}$ représentaient l'effet antibactérien de la colistine sur les bactéries sensibles et les bactéries résistantes, respectivement. Ces paramètres étaient fonction de la concentration

en colistine (C) et différentes fonctions ont été testées, comme indiqué précédemment paragraphe 2.2.1. Avec ce modèle, au début de l'expérience :

$$t = 0 \begin{cases} S = Inoculum \times (1 - mutf) \\ R = Inoculum \times mutf \end{cases}$$

Où $mutf$ était la fraction de bactéries résistantes présentes dans l'inoculum.

Variabilité inter-individuelle

Devant le peu de données disponibles, aucune variabilité inter-individuelle n'a été estimée

Variabilité résiduelle

Les données de densité bactérienne ont été transformées en logarithmes décimaux, et tous les points de données ont été utilisés simultanément pour l'estimation des paramètres. L'erreur résiduelle était supposée additive en échelle logarithmique, mathématiquement :

$$\begin{aligned} \log_{10}(B_{obs}) &= \log_{10}(B_{pred}) + \epsilon_B \\ \text{Avec } \epsilon_B &\sim \mathcal{N}(0, \sigma_B^2) \end{aligned} \quad (2.19)$$

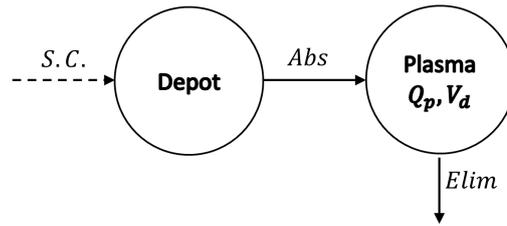
Avec B_{obs} la densité bactérienne observée (en UFC/mL), B_{pred} la densité bactérienne prédite par le modèle (en UFC/mL), ϵ_B le paramètre d'erreur résiduelle correspondant (en $\log_{10}(UFC/mL)$) et σ_B^2 sa variance (en $\log_{10}(UFC/mL)^2$). Les données sous la limite de quantification ont été prises en compte en appliquant la méthode M3 proposée par Beal [21].

2.2.2 Modèles pharmacocinétiques *in vivo*

Le mode d'administration étant la voie sous-cutanée deux modèles d'absorption ont été testés, une absorption "classique" non-saturable (dite du premier ordre) dont la vitesse est linéairement liée à la concentration de médicament administrée, ou une absorption saturable dont la vitesse est liée à la concentration de médicament administrée par un modèle Emax. En se basant sur des travaux antérieurs sur l'homme et la souris [22, 23] nous avons décidé de ne tester qu'un modèle mono compartimental pour la distribution. Deux modèles d'élimination ont aussi été testés, un non-saturable et un autre saturable à l'instar des modèles d'absorption.

Les poids de chaque souris n'étant pas à disposition, afin de s'affranchir de l'erreur induite en corrigeant les doses administrées par un poids moyen, ce sont des mg/kg de colistine qui ont été modélisés au lieu de mg de colistine.

Une représentation schématique du modèle est donnée par la figure 2.6 et l'équation 2.20 le caractérise.

FIGURE 2.6 – Modèle PK *in vivo*

$$\frac{dQ_p}{dt} = Abs \times Q_p - \frac{Elim}{V_d} \times Q_p \quad (2.20)$$

Avec $Abs = k_a$ pour une absorption non saturable et $Abs = \frac{k_{a,max}}{kQ_{50} + Q_p}$ pour une absorption saturable. Et $Elim = CL$ pour une élimination non saturable et $Elim = \frac{ke_{max} Q_p}{keC_{50} + Q_p}$ pour une élimination saturable.

Avec k_a la constante de vitesse d'absorption non saturable (en h^{-1}), $k_{a,max}$ la constante de vitesse d'absorption saturable maximale (en $mg/kg/h$), kQ_{50} la quantité de colistine pour laquelle la vitesse d'absorption saturable était égale à 50% de $k_{a,max}$ (en mg/kg), CL la clairance plasmatique non saturable de colistine (en $L/h/kg$), ke_{max} la constante de vitesse d'élimination saturable maximale (en $mg/kg/h$), keC_{50} la concentration de colistine pour laquelle la vitesse d'élimination saturable était égale à 50% de ke_{max} (en mg/L) et V_d le volume de distribution plasmatique (en L/kg)

Variabilité inter-individuelle

N'ayant qu'une seule mesure par animal, la variabilité inter-individuelle était indiscernable de la variabilité résiduelle et n'a donc pas été estimée.

Variabilité résiduelle

Tous les points de données ont été utilisés simultanément pour l'estimation des paramètres. Un modèle d'erreur résiduelle combinant une erreur additive et une erreur proportionnelle à la prédiction du modèle a été testé, mathématiquement :

$$\begin{aligned} C_{obs} &= C_{pred} + \epsilon_{add,C} + C_{pred} \times \epsilon_{prop,C} \\ \text{Avec } \epsilon_{add,C} &\sim \mathcal{N}(0, \sigma_{add,C}^2) \\ \text{Et } \epsilon_{prop,C} &\sim \mathcal{N}(0, \sigma_{prop,C}^2) \end{aligned} \quad (2.21)$$

Avec C_{obs} la concentration plasmatique en colistine observée (en mg/L), C_{pred} la concentration plasmatique en colistine prédite par le modèle (en mg/L), $\epsilon_{add,C}$ le paramètre d'erreur résiduelle additive (en mg/L), $\epsilon_{prop,C}$ le paramètre d'erreur résiduelle proportionnelle (sans unité), $\sigma_{add,C}^2$ et $\sigma_{prop,C}^2$ leur

variances respectives (en $(mg/L)^2$ et sans unité, respectivement). Les données sous la limite de quantification sont prises en compte en appliquant la méthode M3 proposée par Beal [21].

2.3 Analyse d'identifiabilité des modèles

L'identifiabilité structurelle, aussi appelée identifiabilité *a priori* est une propriété d'un modèle mathématique qui nous renseigne sur la possibilité d'en estimer les paramètres si l'on dispose d'informations parfaites vis à vis de ses entrées et de ses sorties. p.ex. pour un modèle pharmacocinétique monocompartimental, on connaît parfaitement (comprendre sans erreur) les doses administrées au patient ainsi que la concentration plasmatique du produit étudié à tout moment de l'expérience. Un modèle peut être :

- Structurellement globalement identifiable : tous les paramètres du modèle ont une solution unique.
- Structurellement localement identifiable : un ou plusieurs paramètres du modèle possède plus d'une solution, mais en nombre fini.
- Structurellement non-identifiable : un ou plusieurs paramètres du modèle possède une infinité de solutions possibles.

Dans ce travail l'identifiabilité structurelle des modèles testés a été évaluée et ce avant d'essayer d'en estimer les valeurs de paramètres. Pour ce faire la méthode proposée par Shivva et al. [24] a été appliquée. Brièvement, pour chaque modèle considéré, un jeu de paramètres plausibles a été établi en se basant sur la littérature, puis le déterminant de la matrice de Fisher a été calculé pour différentes valeurs de bruit aléatoire, en utilisant le package PopED [25, 26] pour le logiciel R [27]. Ensuite la relation entre le logarithme valeur de bruit aléatoire ($\ln(\sigma^2)$) et le logarithme du déterminant de la matrice de Fisher ($\ln(M_F)$) a été examinée, si elle était linéaire le modèle était structurellement identifiable, sinon il était structurellement non identifiable.

2.4 Validation et sélection des modèles

2.4.1 Graphiques d'adéquation du modèle aux données et erreur d'estimation des paramètres

Pour tous les modèles testés, les graphiques de base d'adéquation du modèle (Prédictions vs Observations, Prédictions individuelles vs Observations) ont été examinés. La précision d'estimation des paramètres calculée lors l'étape \$COVARIANCE de NONMEM pour chaque modèle testé a été évaluée et les modèles ayant au moins un paramètre avec une erreur résiduelle standard (RSE) $>100\%$ n'ont pas été retenus. La corrélation entre les estimations des paramètres calculée lors de cette même étape a aussi été examinée, si certains paramètres présentaient un coefficient de corrélation supérieur à 95% le modèle a été rejeté.

2.4.2 NPDE

Les NPDE [28] ont été calculés en se basant sur 1000 simulations. De part leur construction les NPDE d'un modèle décrivant adéquatement les données (prédictions proches des observations, paramètres non corrélés et non biaisés) doivent être normalement distribués avec une moyenne égale à 0 et une variance égale à 1. Ceci a été vérifié en suivant les recommandations de Nguyen et al. [29], en utilisant un test de Student pour comparer la moyenne à 0, un test de Fisher pour comparer la variance à 1 et un test de Shapiro-Wilks pour tester la normalité. Une p-valeur globale a été obtenue en prenant la plus basse des trois valeurs multipliée par 3 (correction de Bonferroni [30]). Les tests étaient considérés significatifs si la p-valeur était inférieure à 0.05. Les résultats des tests statistiques ainsi que les graphiques représentant les NPDEs vs Observations et NPDE vs Temps ont été pris en compte dans l'évaluation de l'adéquation des modèles.

2.4.3 Critères statistiques

Les modèles conservés après examen de leur adéquation aux données, erreurs d'estimation des paramètres et NPDE ont ensuite été comparés sur des critères statistiques. Lorsque les modèles comparés étaient imbriqués (i.e. le modèle le plus simple peut être obtenu en fixant à 0 certains paramètres du modèle le plus compliqué), les valeurs fonctions objectives (OFV) calculées par NONMEM, des deux modèles étaient comparées et le modèle le plus complexe (plus de paramètres), n'était conservé que sa fonction objective était au moins 10.83 points inférieure ($p < 0.001$ avec 1 degré de liberté). Lorsque les modèles comparés n'étaient pas imbriqués, le critère d'information Akaike (AIC) était utilisé, le modèle ayant l'AIC le plus faible était considéré meilleur.

2.4.4 Vérifications prédictives visuelles (VPC)

Pour les modèles sélectionnés, des VPCs [31] avec stratification sur la concentration en colistine ajoutée au système (PD *in vitro*)/administrée (PK *in vivo*) ont été réalisés en effectuant 1000 simulations avec les paramètres finaux des modèles, et en présentant sur un même graphique, les observations, le 10^e, le 50^e et le 90^e percentile des simulations. L'examen visuel de ces graphiques ont aussi servi à sélectionner le meilleur modèle.

2.4.5 Précision d'estimation des paramètres du modèle final

Une fois un modèle final choisi, la précision d'estimation de ses paramètres a été recalculée en utilisant la technique de Sampling Importance Resampling (SIR). [32]. La technique SIR se décompose en trois étapes :

- Première étape, échantillonnage : Tout d'abord, il faut une distribution hypothétique $h(\theta)$ des paramètres finaux du modèle, par exemple une

distribution normale multivariée ayant pour moyennes les estimation finales des paramètres et pour variances les variances d'estimations calculés par NONMEM (lors de l'étape \$COVARIANCE). Alors, un certain nombre de vecteurs de paramètres sont tirés au sort dans cette distribution.

- Seconde étape, calcul du ratio d'importance (IR) : Pour chacun des vecteurs tirés au sort l'IR pourra être calculé en suivant la formule suivante :

$$IR_i = \frac{\exp(-\frac{1}{2}dOFV_i)}{relPDF_i}$$

$$\text{Avec } dOFV_i = OFV_i - OFV_{ML} \quad (2.22)$$

$$\text{Et } relPDF_i = \frac{PDF_i}{PDF_{ML}}$$

Avec OFV_i et OFV_{ML} les OFV du modèle lorsque les paramètres sont respectivement θ_i le vecteur de paramètres échantillonné, et θ_{ML} le vecteur de paramètres finaux (donnant la meilleure OFV). Et PDF_i et PDF_{ML} les vraisemblances conditionnelles des vecteurs de paramètres θ_i et θ_{ML} (respectivement) étant donné la distribution hypothétique $h(\theta)$ utilisée à l'étape 1.

- Troisième étape, ré-échantillonnage : Des vecteurs de paramètres sont tirés au sort parmi les vecteurs tirés au sort à l'étape 1 avec des probabilités de tirages proportionnelles à leur IR.
- Ensuite la convergence du SIR est évaluée en comparant la distribution des quantiles des $dOFV$ à une distribution du χ^2 à n degrés de libertés, n étant le nombre de paramètres du modèle. Si la distribution des quantiles des $dOFV$ y est superposée, le SIR a convergé et les erreurs d'estimations réelles ont été obtenues. Sinon, la procédure est recommencée en partant de la distribution des paramètres obtenue après ré-échantillonnage comme distribution de départ $h(\theta)$

La commande suivante à été utilisée pour les SIR de ce travail :

```
sir -samples=1000,1000,1000,2000 -resamples=200,400,500,1000
```

2.5 Simulations de profils pharmacodynamiques *in vivo*

Afin de prendre en compte une différence de physiologie bactérienne entre *l'in vitro* et *l'in vivo*, ainsi que la différence d'unité de densité bactérienne (UFC/mL pour les données *in vitro* et UFC/mg pour les données *in vivo*) les paramètres de croissance bactérienne ($Inoculum, k_g, k_d$ et B_{max}) ont été estimés à partir des données de densité bactérienne des souris du groupe contrôle. Ensuite, les valeurs des autres paramètres des modèles PD *in vitro* et PK *in vivo* sélectionnés ont été fixées aux valeurs estimées et les deux modèles ont

été combinés afin de prédire l'efficacité de la colistine chez les souris présentant une infection du poumon due à *P. aeruginosa*. Il a été fait l'hypothèse que seule la fraction libre (i.e. non liée aux protéines plasmatiques) de colistine produisait un effet, la concentration libre en colistine a été obtenue en multipliant concentration plasmatique totale par la fraction libre f_u estimée par Cheah et al. a 0.084 [22]. La densité bactérienne prédite par le modèle combiné a ensuite été comparée aux résultats obtenus chez les souris afin d'évaluer la qualité de la prédiction.

2.6 Logiciels et algorithmes

Pour l'estimation des paramètres, les SIRs et les VPCs le logiciel NON-MEM dans sa version 7.4.3 (ICON plc., Irlande) ainsi que Perl speaks NON-MEM [33] ont été utilisés. Le logiciel R [27] a été pour toutes les étapes du traitement de données et plus particulièrement les packages :

- PopED [25, 26] pour l'évaluation de l'identifiabilité des modèles
- npde [28] pour calculer les NPDE et effectuer les tests statistiques sur ces derniers
- xpose [34] pour tracer les graphiques d'adéquation des modèles aux données et les VPC
- mrgsolve [35] pour effectuer les simulations de bactéricide attendue avec le modèle PK/PD final
- ggplot2 [36] pour tracer les autres graphiques

Le logiciel PowerPoint2016 (Microsoft, Etats-Unis) a été utilisé pour tracer les schémas illustrant les modèles

Chapitre 3

Résultats

3.1 Identifiabilité

Tous les modèles testés se sont avérés structurellement identifiables. Par exemple, la relation entre le logarithme et la valeur de bruit aléatoire ($\ln(\sigma^2)$) et le logarithme du déterminant de la matrice de Fisher ($\ln(M_F)$) pour un modèle de croissance avec bactéries persistantes, un effet de la colistine de type E_{max} et et deux sous-populations bactériennes est présentée en figure 3.1

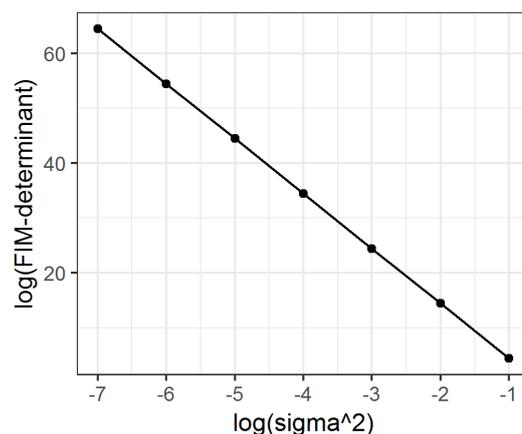


FIGURE 3.1 – Analyse de l’identifiabilité du modèle PD *in vitro* final - Visualisation de la relation entre le logarithme du déterminant de la matrice d’information de Fisher (log(FIM-determinant) en ordonnée) et le logarithme de la variance du bruit aléatoire (log(σ^2) en abscisse)

La relation étant linéaire, le modèle était donc structurellement identifiable. Les codes utilisés pour pour cette analyse est disponible en Annexe [A](#)

3.2 Time-kill curve *in vitro*

Les résultats de comptages bactériens *in vitro* sont présentés figure 3.2

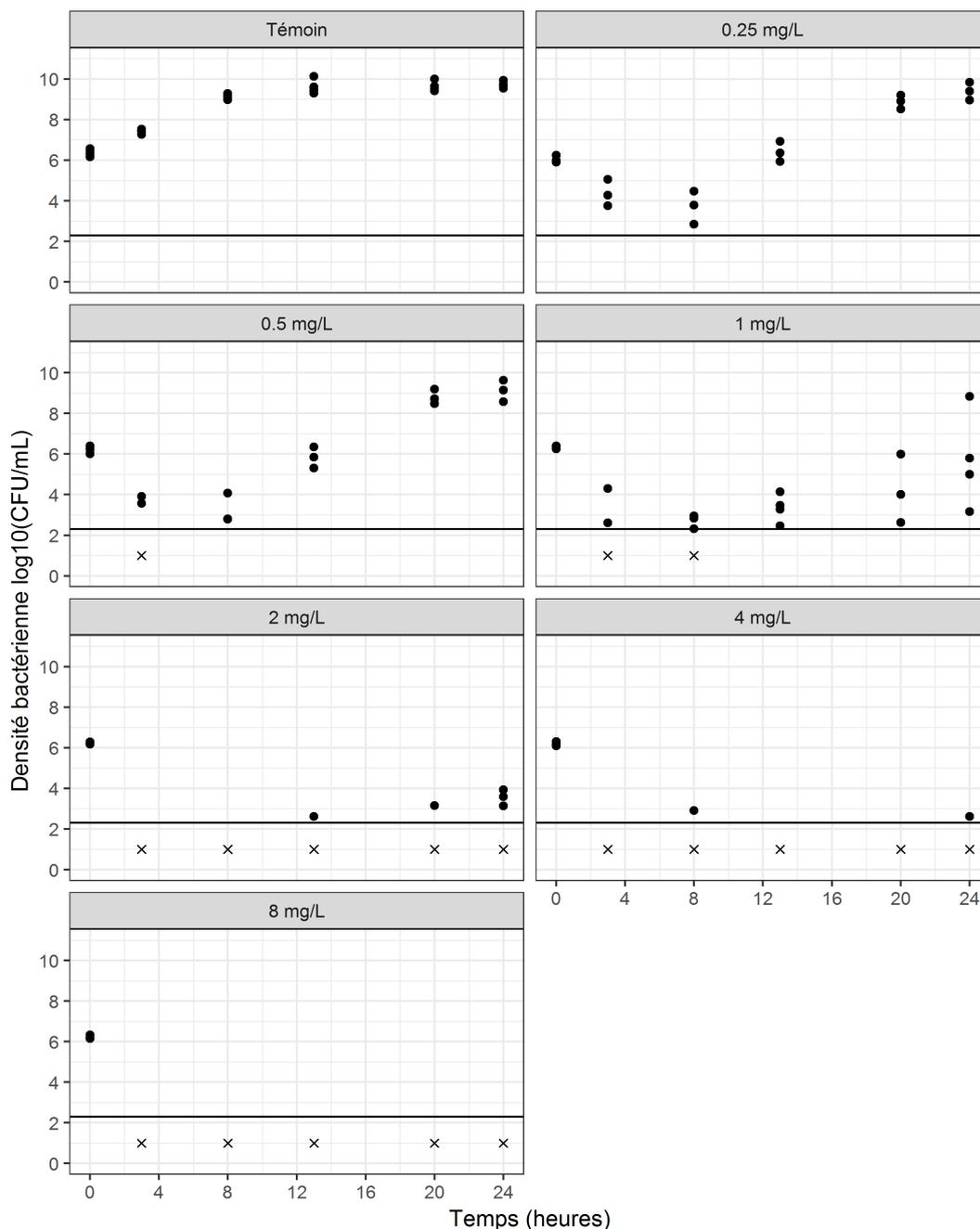


FIGURE 3.2 – Mesures de densités bactériennes obtenues lors de time-kill curve *in vitro* pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 exposé à la colistine, à des concentrations allant de 0.25 à 8 mg/L. Les résultats des expériences témoins sans antibiotiques sont aussi présentés. Les résultats sont représentés en logarithmes décimaux. Le trait horizontal noir représente la LOQ (200 UFC/mL). Les points représentent des mesures supérieures à la LOQ et les croix représentent les mesures inférieures à la LOQ

3 à 4 réplicats ont été réalisés par concentration pour un total de 162 points

de données (56 <LOQ). Le groupe contrôle ainsi que les bactéries ayant repoussé ont atteint un plateau à environ 10^9 UFC/mL. Une repousse fut observée pour les concentrations allant de 0,25 à 2 mg/L. Une bactéricidie complète observée pour les concentrations 4 et 8 mg/L.

3.3 Modèles pharmacodynamiques *in vitro*

Modèles de croissance bactérienne Les meilleurs modèles incluant des bactéries persistantes ou une fonction logistique pour décrire la croissance bactérienne, avaient une adéquation similaire aux données (AIC = 92 vs 89 respectivement), et le modèle comportant une fonction logistique aurait dû être conservé. Cependant le modèle a été construit avec un objectif prédictif, et l'utilisation d'un modèle avec bactéries persistantes avait l'avantage de pouvoir prendre en compte un potentiel effet inoculum, contrairement au modèle de croissance logistique. Le modèle incluant des bactéries persistantes a été sélectionné. Dans ce modèle, la constante de vitesse de mort k_d n'ayant pas pu être estimée (corrélation >95% avec k_g), elle a été fixée à la valeur estimée par Nielsen et al.

Modèles d'effet antibiotique Les OFV des modèles incluant différentes fonction d'effet ayant été testées sont présentées dans le tableau suivant :

Fonction	$n_{parametres}$	OFV
Linéaire	1	100.076
Puissance	2	84.368
E _{max}	2	74.902
E _{max} sigmoïde	3	Non identifiable (RSE>100%)

Le meilleur modèle avait un effet de l'antibiotique suivant une fonction E_{max} sans coefficient de Hill.

Modèles de résistance à l'antibiotique Le meilleur modèle de résistance à l'antibiotique était le modèle d'hétérorésistance à 2 sous-populations (AIC=92 *versus* 110). Dans ce modèle, les paramètres d'effet E_{max} , EC_{50} avaient une valeur différente pour chacune des sous-populations. Une seule valeur de k_g a été estimée car, l'estimation d'un k_g différent pour chaque population n'entraînait pas d'amélioration significative de l'OFV.

Modèle final Le modèle final était un modèle avec bactéries persistantes, deux sous populations bactériennes et un modèle E_{max} pour décrire l'effet de la colistine. Il avait une OFV = 74.902, une valeur d'AIC=92.902 et pour paramètres :

TABLE 3.1 – Paramètres du modèle PD *in vitro* final

Paramètre	Description	Unité	Valeur [IC95%]
<i>Inoculum</i>	Inoculum bactérien à t=0h	UFC/mL	$10^{6.02}$ [$10^{5.87} - 10^{6.19}$]
<i>mutf</i>	Proportion de bactéries résistantes à t=0h	\emptyset	$10^{-5.65}$ [$10^{-6.29} - 10^{-5.02}$]
k_g	Constante de vitesse de croissance bactérienne	h^{-1}	1.65 [1.44 – 1.88]
k_d	Constante de vitesse de mort bactérienne naturelle	h^{-1}	0.179 [fixé]
B_{max}	Densité bactérienne au plateau	UFC/mL	$10^{9.52}$ [$10^{9.32} - 10^{9.75}$]
E_{max-S}	Constante de vitesse maximale d'effet de la colistine sur les bactéries sensibles	h^{-1}	6.14 [5.08 – 8.23]
E_{max-R}	Constante de vitesse maximale d'effet de la colistine sur les bactéries résistantes	h^{-1}	1.76 [1.56 – 2.00]
EC_{50-S}	Concentration en colistine nécessaire pour atteindre 50% d' E_{max-S}	mg/L	0.333 [0.177 – 0.563]
EC_{50-R}	Concentration en colistine nécessaire pour atteindre 50% d' E_{max-R}	mg/L	0.880 [0.632 – 1.32]
σ_B^2	Variance de l'erreur résiduelle additive en log10()	$\log_{10}(UFC/mL)^2$	0.556 [0.442 – 0.758]

Les NPDE du modèle PD *in vitro* final sont présentés figure 3.3

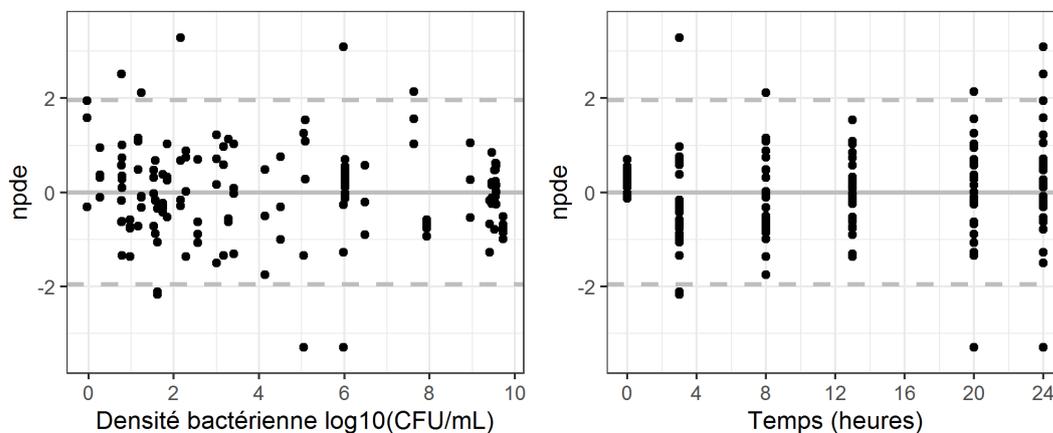


FIGURE 3.3 – NPDE *versus* prédictions (à gauche) et NPDE *versus* temps (à droite) pour le modèle PD *in vitro* final

TABLE 3.2 – Tests sur les NPDE du modèle PD *in vitro* final

Test	Description	p-valeur
Student	Comparaison de la moyenne à 0	0.647 (NS)
Fisher	Comparaison de la variance à 1	0.138 (NS)
Shapiro-Wilks	Evaluation de la normalité	0.000262 (S)
Global	Correction de Bonferroni	0.000785 (S)

(S) = Test significatif au risque $\alpha = 5\%$

(NS) = Test non-significatif au risque $\alpha = 5\%$

Le test de Shapiro-Wilks nous indique que les NPDE ne sont pas normalement distribués. Un histogramme des NPDE est proposé :

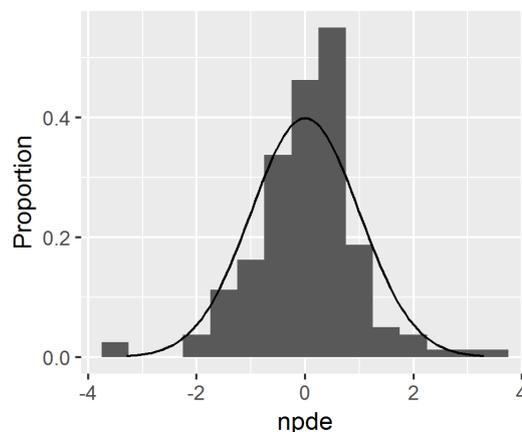


FIGURE 3.4 – Distribution des NPDE du modèle PD *in vitro* final - La courbe représente la distribution théorique d'une variable normale de moyenne 0 et de variance 1

D'après la figure 3.4, la non-normalité des NPDE est due à une proportion trop forte de NPDE proche de 0. En examinant la figure 3.3, on constate une concentration de NPDE proche de 0 pour le temps 0h et une prédiction proche de $10^6 UFC/mL$. Ces points correspondent à l'inoculum de départ. Pour une observation sa NPDE reflète le quantile de cette observation dans la distribution des prédictions du modèle (établie par simulation) pour cette observation, la NPDE sera d'autant plus proche de 0 que l'observation sera proche de la médiane des simulations. La sur-représentation des NPDE proche de 0 pour les observations au temps 0h, nous indique donc que les observations sont très proches de la médiane des simulations effectuées avec le modèle final. Ceci peut s'expliquer par le modèle d'effet aléatoire utilisé, en effet, seule une variabilité résiduelle additive (en $\log_{10}()$) a été estimée, impliquant une variabilité identique pour tous les points de données. Or les mesures de densité bactérienne au début de l'expérience étaient beaucoup moins variables que les mesures subséquentes, donc notre modèle d'effet aléatoire n'est pas adapté pour décrire les données. Une solution serait de décomposer la variabilité en variabilité inter-individuelle et en variabilité résiduelle, mais le manque de données nous en a empêché. De plus, la variabilité sur les autres observations étant correctement décrite, le modèle a été conservé.

Les VPCs du modèle PD *in vitro* final sont présentés figure 3.5

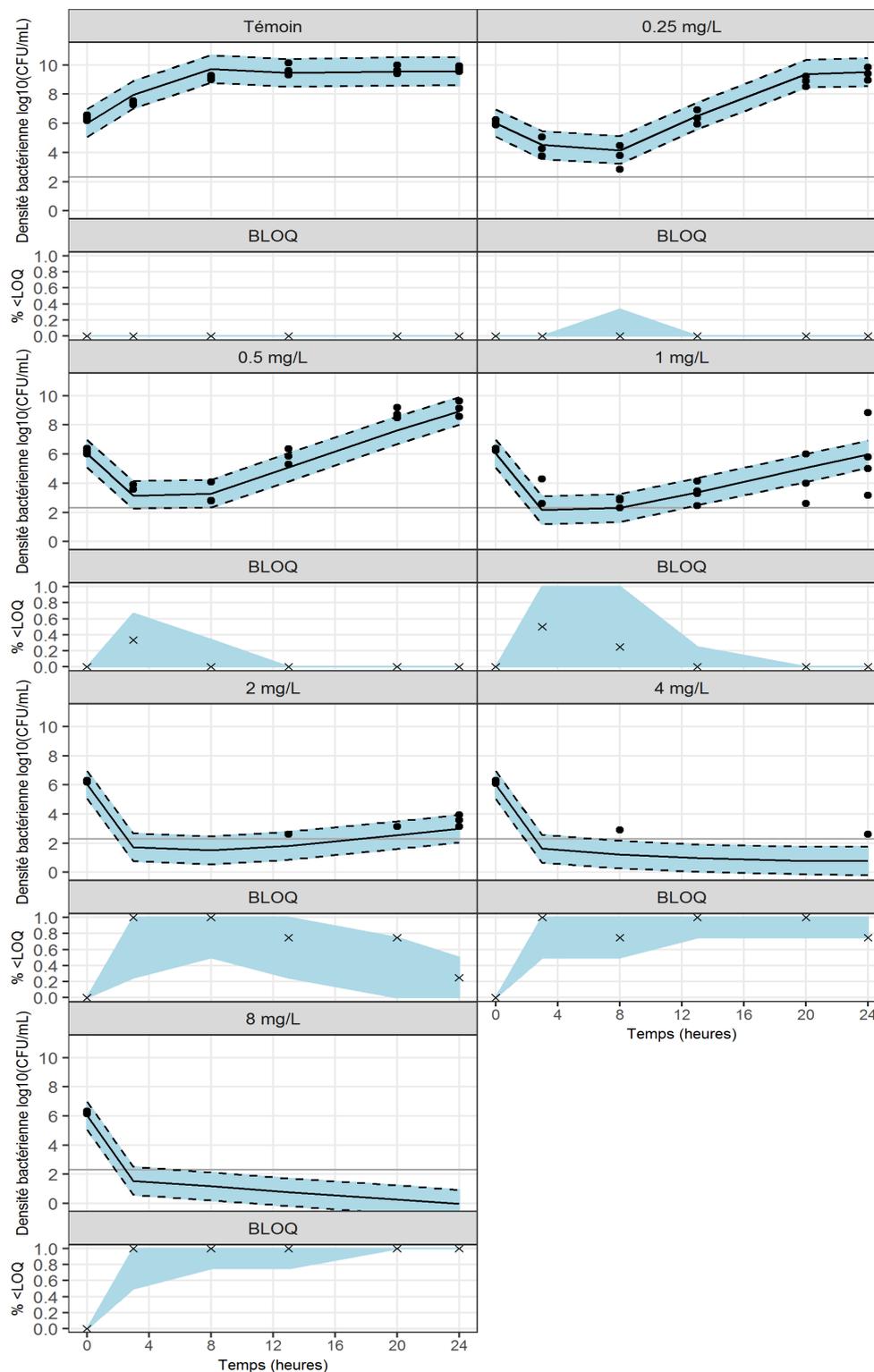


FIGURE 3.5 – VPCs du modèle PD *in vitro* final. Les points représentent les données observées et la zone bleue représente l'intervalle de prédiction à 80% construit à partir de 1000 simulations du modèle final. Les panneaux supérieurs présentent les données au dessus de la LOQ et les panneaux inférieurs présentent les données sous la LOQ. La LOQ (200 UFC/mL) est représentée par un trait horizontal gris sur les panneaux supérieurs.

Les prédictions du modèle sont compatibles avec les données observées pour toutes les concentrations sauf la concentration 1 mg/L. Le code NON-MEM du modèle est disponible en Annexe B

3.4 Données pharmacocinétiques *in vivo*

Les résultats des mesures de colistinémie plasmatique chez la souris sont présentés figure 3.6

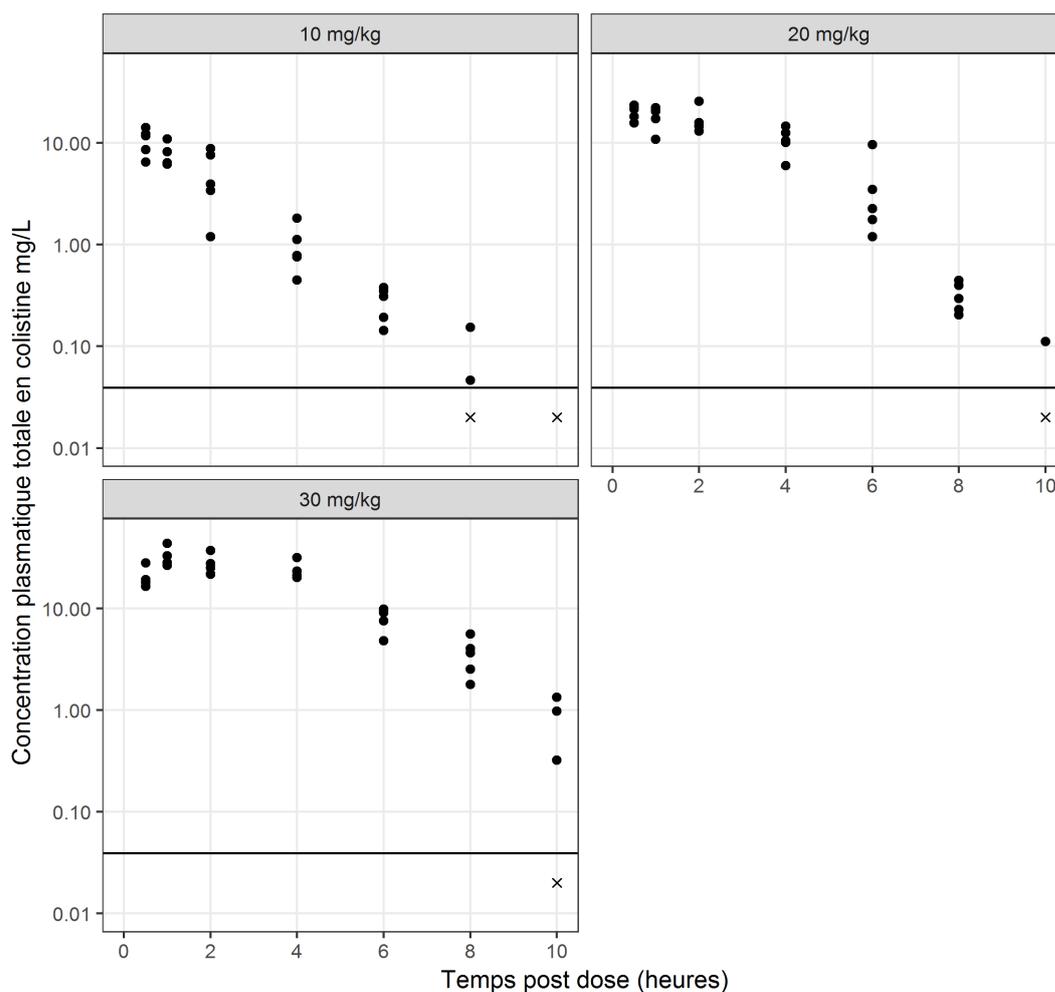


FIGURE 3.6 – Mesures de colistinémie plasmatique totale obtenues chez la souris neutropénique infectée par *P. aeruginosa* ATCC27853 par voie pulmonaire, après injection de 10,20 et 30 mg/kg de colistine. Le trait horizontal noir représente la LOQ (0.030 mg/L). Les points représentent des mesures supérieures à la LOQ et les croix représentent les mesures inférieures à la LOQ

105 points de données ont été obtenus (14 <LOQ). Le temps auquel la colistinémie était maximale (t_{max}) augmentait avec la dose administrée (30 min

pour 10 mg/kg 1h pour 30 mg/kg). La pharmacocinétique était donc non-linéaire.

3.5 Modèles pharmacocinétiques *in vivo*

Modèle final Le modèle final comprenait une absorption non-saturable d'ordre 1, et une élimination saturable de type Emax. Sa OFV = 288.787, une valeur d'AIC=300.787 et pour paramètres :

TABLE 3.3 – Paramètres du modèle PK *in vivo* final

Paramètre	Description	Unité	Valeur [IC95%]
k_a	Constante de vitesse d'absorption de la colistine	h^{-1}	2.90[1.59 – 5.49]
ke_{max}	Constante de vitesse d'élimination saturable maximale de la colistine	$mg/h/kg$	4.27[3.51 – 5.27]
ke_{C50}	Colistinémie plasmatique à 50% d'élimination saturable	mg/L	4.21[2.31 – 7.34]
V_d	Volume de distribution	L/kg	0.848[0.642 – 1.09]
$\sigma_{add,C}^2$	Variance de l'erreur résiduelle additive	$(mg/L)^2$	0.218[0.136 – 0.326]
$\sigma_{prop,C}^2$	Variance de l'erreur résiduelle proportionnelle	\emptyset	0.00806[0.00369 – 0.0130]

Les NPDE du modèle PK *in vivo* final sont présentés figure 3.7

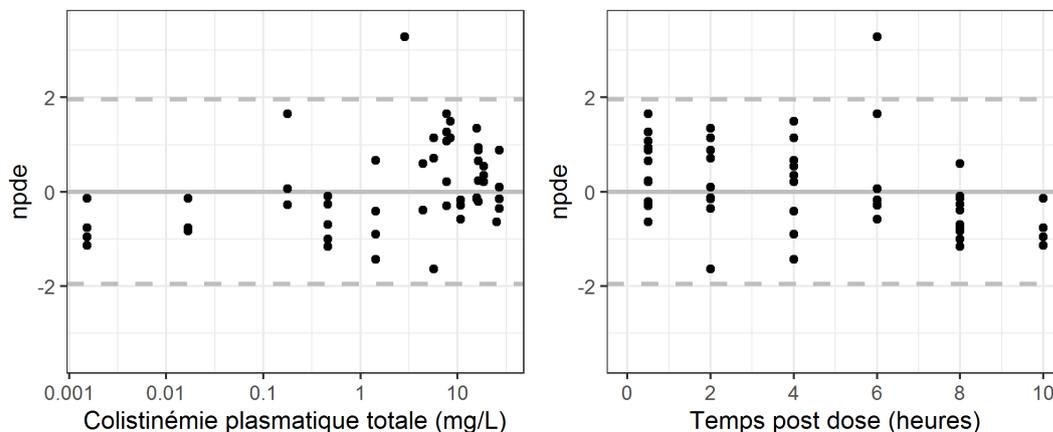


FIGURE 3.7 – NPDE *versus* prédictions (à gauche) et NPDE *versus* temps (à droite) pour le modèle PK *in vivo* final

TABLE 3.4 – Tests sur les NPDE du modèle PD *in vitro* final

Test	Description	p-valeur
Student	Comparaison de la moyenne à 0	0.592 (NS)
Fisher	Comparaison de la variance à 1	0.707 (NS)
Shapiro-Wilks	Evaluation de la normalité	0.0983 (NS)
Global	Correction de Bonferroni	0.295 (NS)

(S) = Test significatif au risque $\alpha = 5\%$

(NS) = Test non-significatif au risque $\alpha = 5\%$

Aucun des tests n'est significatif, les NPDE du modèle sont normalement distribués avec une moyenne 0 et une variance 1.

Les VPCs du modèle PK *in vivo* final sont présentés figure 3.8

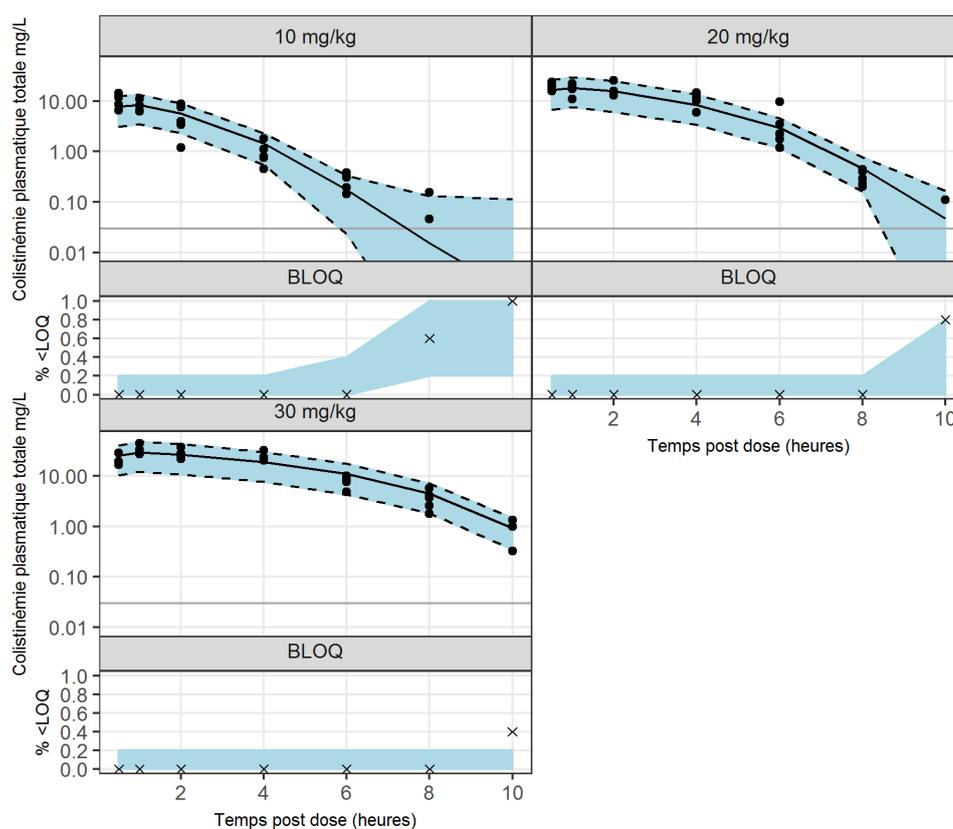


FIGURE 3.8 – VPCs du modèle PK *in vivo* final. Les points représentent les données observées et la zone bleue représente l'intervalle de prédiction à 80% construit à partir de 1000 simulations du modèle final. Les panneaux supérieurs présentent les données au dessus de la LOQ en échelle semi-logarithmique et les panneaux inférieurs présentent les données sous la LOQ. La LOQ (0.030 mg/L) est représentée par un trait horizontal gris sur les panneaux supérieurs.

Les prédictions du modèle sont compatibles avec les données observées pour toutes les doses administrées. Le code NONMEM du modèle est disponible en Annexe C

3.6 Time-kill curve *in vivo*

Les résultats des comptages bactériens chez la souris sont présentés figure 3.9

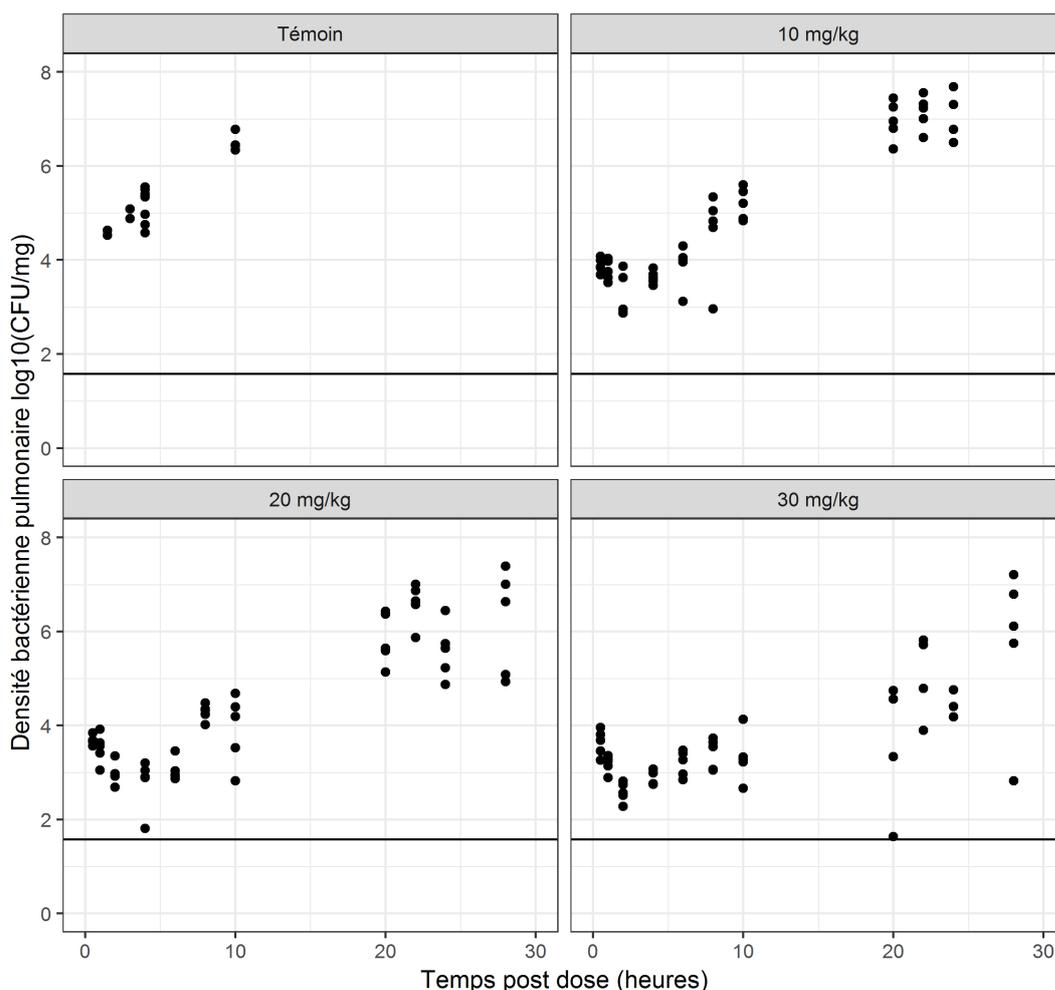


FIGURE 3.9 – Mesures de densité bactériennes obtenues lors de "time-kill curve *in vivo*" pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 exposé à la colistine dans un modèle murin d'infection pulmonaire. Les résultats des doses 10, 20 et 30 mg/kg sont présentés, les résultats des expériences témoins injection d'antibiotique sont aussi présentés. Les résultats sont représentés en logarithmes décimaux. Le trait horizontal noir représente la LOQ (37.5 UFC/mg). Les points représentent des mesures supérieures à la LOQ.

173 points de donnée ont été obtenus ($0 < \text{LOQ}$). Les souris du groupe contrôle sont toutes mortes après 10h, 50 % des souris sont mortes après 22h dans le groupe 10 mg/kg et toutes les souris des groupes 20 et 30 mg/kg ont survécu 28h. Les souris mortes ont été exclues de l'analyse. On observe une diminution initiale de la densité bactérienne puis une repousse pour toutes les doses.

3.7 Estimation des paramètres de croissance bactérienne *in vivo*

TABLE 3.5 – Paramètres de croissance bactérienne du modèle PD *in vivo* final

Paramètre	Description	Unité	Valeur [IC95%]
$Inoculum$	Inoculum bactérien à $t=0h$	UFC/mg	$10^{4.19} [10^{3.79} - 10^{4.53}]$
k_g	Constante de vitesse de croissance bactérienne	h^{-1}	$0.788 [0.609 - 1.02]$
k_d	Constante de vitesse de mort bactérienne naturelle	h^{-1}	0.179 [fixé]
B_{max}	Densité bactérienne au plateau	UFC/mg	$10^{6.54} [10^{6.09} - 10^{7.92}]$
$\sigma_{add,C}^2$	Variance de l'erreur résiduelle additive en $\log_{10}()$	$\log_{10}(UFC/mg)^2$	$0.0664 [0.0456 - 0.0940]$

3.8 Simulations

Les résultats des simulations réalisées avec le modèle PK/PD combiné sont présentés figure 3.10

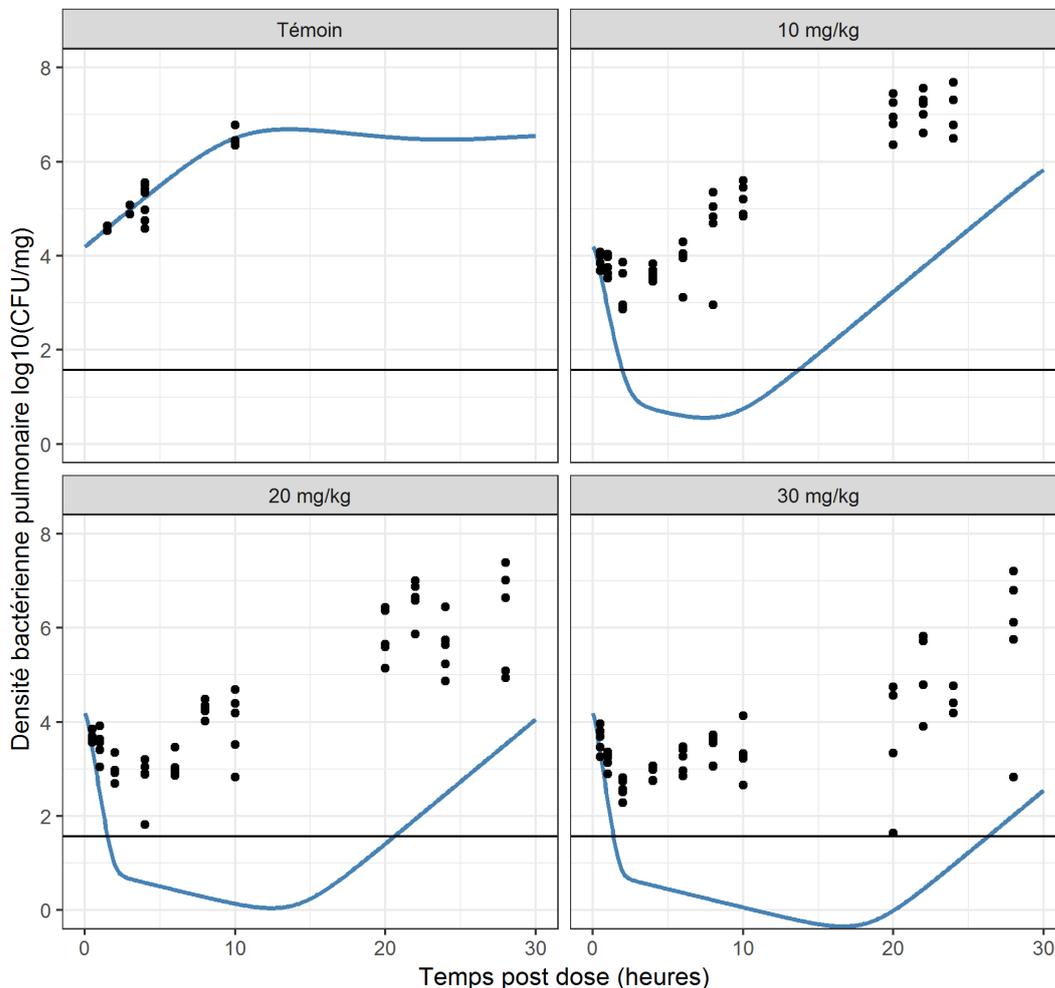


FIGURE 3.10 – Prédictions typiques du modèle PK/PD combiné. Les données observées sont représentées par des points et les courbes bleues représentent les prédictions obtenues en effectuant des simulations sans variabilité résiduelle avec le modèle PK/PD combiné.

Le modèle combiné prédisait un effet de la colistine plus important qu'observé expérimentalement *in vivo*. Les codes utilisés pour effectuer les simulations sont disponibles en Annexe D

Chapitre 4

Discussion

Le modèle final PD *in vitro* n'incluait pas de retour des bactéries à l'état de croissance après un passage en phase de persistance. Ce choix a été fait car les bactéries persistantes n'apparaissent que lorsque la densité bactérienne est forte et s'approche du plateau. Pour qu'un retour des bactéries à l'état de croissance soit possible il faudrait donc qu'il y ait d'abord une forte densité bactérienne (apparition des bactéries persistantes) puis une décroissance bactérienne (réactivation des bactéries persistantes). Or, une telle évolution de la densité bactérienne n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales, justifiant la décision de ne pas tester l'ajout au modèle d'un paramètre de retour à l'état de croissance des bactéries persistantes.

Deux autres études de la PD *in vitro* de la colistine sur *P. aeruginosa* avec modélisation de time-kill curves ont déjà été réalisées par Mohamed et al. [11] et Bulitta et al. [9]. Le modèle final de Mohamed et al. incluait un développement de résistance adaptative, tandis que celui de Bulitta et al., à l'instar du nôtre, incluait une hétérorésistance. Ces deux types de modèles de résistance bactérienne ont des implications mécanistiques différentes mais peuvent décrire avec une même adéquation des données identiques. Par conséquent, comme montré par le travail de Jacobs et al. [7], ces modèles ne sont pas, dans le cadre d'expériences de time-kill curve à concentration constante, différentiables sur des critères purement statistiques. Or dans les trois études, la sélection du modèle final s'est basée principalement sur des critères statistiques, ce qui explique la diversité des modèles finaux.

La non adéquation des prédictions du modèle PD *in vitro* pour la concentration 1 mg/L pourrait être expliquée par le fait que cette concentration serait proche d'une concentration limite, juste assez suffisante pour agir sur la sous-population résistante. En effet à cette concentration limite, il suffirait d'une faible variation de la proportion de bactéries résistantes à l'état initial (*mut f*) d'une répllication sur l'autre pour observer tantôt une repousse bactérienne, tantôt son absence.

Dans le modèle PD *in vitro* final la constante de vitesse de mort k_d a été fixée à une valeur retrouvée dans l'étude de Nielsen et al. [18] car l'estimation simultanée d'un k_g et d'un k_d était impossible (paramètres corrélés

>95%). Pourtant le modèle était structurellement identifiable, mais la corrélation dans l'estimation des paramètres ici nous renseigne sur un autre type d'identifiabilité, l'identifiabilité pratique [37].

Là où dans l'analyse de l'identifiabilité structurelle, nous nous plaçons dans des conditions idéales, avec des données parfaites et sans bruit, s'intéresser à l'identifiabilité pratique d'un modèle équivaut à poser la question "Puis-je estimer les paramètres de mon modèle de façon précise, compte tenu des imperfections inhérentes à mes données?".

Donc la très forte corrélation entre les estimations de k_g et k_d nous indique que notre modèle, bien que structurellement identifiable s'est avéré pratiquement non-identifiable. De tels problèmes sont aussi survenus, lors de la modélisation PK *in vivo* lorsque l'estimation simultanée d'une absorption linéaire et non-linéaire a été testée (*idem* pour l'élimination.).

Cela ne veut pas pour autant dire que l'analyse d'identifiabilité structurelle est inutile, car un modèle structurellement non-identifiable sera par définition pratiquement non-identifiable. L'analyse d'identifiabilité structurelle pourrait être une première étape dans le développement d'un modèle. Elle pourrait, pour tenter de prévenir les problèmes de non-identifiabilité pratique, être suivie d'une étape d'*optimal design*. L'*optimal design* est une technique permettant d'utiliser un modèle mathématique pour optimiser la conception (*to design* en anglais) d'études expérimentales. Brièvement, cela consiste à se servir d'un modèle mathématique que l'on pense approprié pour décrire le phénomène que l'on veut étudier, et de chercher les conditions expérimentales (*p.ex.* temps de prélèvement, doses à administrer) nous permettant de maximiser la quantité d'information contenues dans les données résultant de l'expérience. Une explication plus détaillée à propos d'*optimal design* est proposée par Atkinson et al. [38]. L'*optimal design* ne peut se réaliser qu'en amont des expérimentations, et donc montre l'intérêt que l'on pourrait avoir à associer le/la pharmacométricien/enne à l'étude dès la phase de conception.

Avec le modèle PK *in vivo* final, la non-linéarité observée a été prise en compte par une élimination non linéaire. Ceci est compatible avec le modèle obtenu par Landersdorfer et al. [39] développé à partir de données obtenues lors de l'étude de la PK de la polymyxine B sur un modèle de souris neutropéniques infectées. Leur modèle est plus complexe avec deux compartiments, une absorption non-linéaire et linéaire simultanée, ainsi qu'une élimination non-linéaire et linéaire simultanée, mais leur étude a été réalisée avec plus grande gamme de doses (5 doses allant de 2 à 40 mg/kg), leur permettant d'avoir moins de problèmes d'identifiabilité pratique.

Dans une étude menée par Cheah et al. [22] il a été constaté que l'efficacité de la colistine administrée par voie sous cutanée était moins importante pour un modèle murin d'infection pulmonaire que pour un modèle murin d'infection musculaire. Ces résultats pourraient indiquer qu'il n'y a pas d'équilibre rapide entre de colistinémie plasmatique et la colistinémie pulmonaire. Leur résultats pourraient aussi révéler des problèmes d'atteinte de la cible,

en effet, *P. aeruginosa* a la capacité de former des biofilms lors d'une infection pulmonaire [40], les biofilms sont des amas bactériens enrobés d'une matrice polymérique, cette structure les protège contre d'éventuelles attaques, par exemple par des antibiotiques. Une autre explication potentielle pourrait être la présence de mucine dans les poumons, la mucine est une grande protéine fortement glycosylée entrant dans la composition du milieu pulmonaire, connue pour fixer la colistine [41] et donc diminuer la concentration disponible pour agir. Pour les simulations effectuées dans ce travail, l'effet de la colistine a été considéré comme étant lié aux concentrations plasmatiques libre en colistine. Donc, l'absence de prise en compte de la présence de mucine, de la formations de biofilms et/ou d'une différence entre colistinémie plasmatique et colistinémie pulmonaire pourrait expliquer la différence observée entre les simulations et les données expérimentales.

Chapitre 5

Conclusion

Dans ce travail, des time-kill curve *in vitro* ont été réalisées et un modèle semi-mécanistique a été développé à partir des résultats. Ensuite, une expérience PK/PD de "time-kill curve *in vivo*" sur un modèle de souris immuno-déprimées ayant une infection pulmonaire, a été réalisée et un modèle PK a été développé à partir des données de colistinémie plasmatique. Ces deux modèles ont ensuite été combinés afin de simuler l'évolution de la densité bactérienne attendue dans l'expérience *in vivo* puis les simulations ont été comparées aux données réellement observées.

Les simulations sur-estimaient l'effet de la colistine et nous avons émis trois hypothèses sur les raisons de cette sur-estimation, toutes liées à particularités des infections pulmonaires. Ce résultat nous montre que même si la modélisation mathématique des données PK/PD nous permet théoriquement de faire des extrapolations à des situations non testées expérimentalement, une certaine prudence est de mise dans l'interprétation de ces extrapolations.

Pour poursuivre ce travail, il pourrait être intéressant de comparer les simulations avec des résultats d'expérience sur modèle murin d'infection de la cuisse, afin de voir si les prédictions sont plus proche de la réalité, dans la mesure où une étude de Cheah et al. (citation) a montré une plus grande efficacité de la colistine contre une infection musculaire plutôt que pulmonaire.

Il serait aussi envisageable de recommencer des études de time-kill curve *in vitro* en utilisant un milieu artificiel mimant l'environnement pulmonaire tel que décrit dans la publication de Kirchner et al. [42], puis de développer un nouveau modèle PD décrivant ces données et de ce servir de ce modèle pour faire des prédictions à comparer avec les résultats *in vivo* du présent travail.

Annexe A

Analyse d'identifiabilité structurelle du modèle *in vitro* final

A.1 Code C++ du modèle

```

$PROB
- Author: Vincent Aranzana-Climent
- Date: 17/04/18
- Structure: persistsers, 2 subpopulations, Emax effect, 2 different kg
- Implementation: ODE
- Error model: Log10 Additive
- Random effects: None
$PARAM @annotated
Log10Inoc : 6 : Initial bacterial density (log10(CFU/mL))
kg : 0.919 : Bacterial growth rate constant (1/h)
kd : 0.179 : Bacterial death rate constant (1/h)
Bmax : 2.19*10^8 : Bacterial count in the stationary phase (CFU/mL)
Emax : 21 : Maximal achievable kill rate constant by colistin (1/h)
EC50S : 1.16 : Colistin concentration that produces 50% of Emax
  for the susceptible population (mg/L)
EC50R : 20 : Colistin concentration that produces 50% of Emax
  for the resistant population (mg/L)
mutf : -2.83 : Frequency pre-existing resistant population (log10())
C : 0 : Colistin concentration (mg/L)
$CMT @annotated
SENSI : Susceptible bacteria (CFU/mL)
PERSISTS : Susceptible Persistent bacteria (CFU/mL)
RESIST : Resistant bacteria (CFU/mL)
PERSISTR : Resistant Persistent bacteria (CFU/mL)
$MAIN
SENSI_0 = pow(10,Log10Inoc) * (1 - pow(10,mutf)) ;
RESIST_0 = pow(10,Log10Inoc) * (pow(10,mutf)) ;
$ODE
double BTOT = SENSI + PERSISTS + RESIST + PERSISTR ;
dxdt_SENSI = kg*SENSI - kd*SENSI - (Emax*C/(EC50S+C))*SENSI
-(kg-kd) * ((BTOT)/Bmax)) * SENSI;
dxdt_PERSISTS = -kd * PERSISTS + (kg-kd) * ((BTOT)/Bmax)) * SENSI;

```

```
dxdt_RESIST = kg*RESIST - kd*RESIST - (Emax*C/(EC50R+C))*RESIST
-(kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) * RESIST;
dxdt_PERSISTR = -kd * PERSISTR + (kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) * RESIST;
$CAPTURE @annotated
SENSI : Susceptible bacteria (CFU/mL)
PERSISTS : Susceptible Persistent bacteria (CFU/mL)
RESIST : Resistant bacteria (CFU/mL)
PERSISTR : Resistant Persistent bacteria (CFU/mL)
BTOT : Total number of bacteria (CFU/mL)
```

A.2 Code R pour l'analyse

```
library(mrgsolve)
library(dplyr)
library(PopED)
library(ggplot2)
#### mrgSolve + PopED common parameters ####

#Read the model file
model <- mread("persisters-2subpopulations")

#Declare covariates, here colistin concentrations
covariatesForEachGroup <- list(c(C=0),
c(C=0.25),
c(C=0.5),
c(C=1),
c(C=2),
c(C=4),
c(C=8))

#Declare last time point to be simulated
lastTimePoint <- 30 #in hours

#Declare parameter values
parameterValues <-
c(
Log10Inoc = 6,
kg = 0.919,
kd = 0.179,
Bmax = 2.19 * 10 ^ 8,
Emax = 21,
EC50S = 1.16,
EC50R = 25,
mutf = -2.83
)
#### PopED specific parameters ####
```

```
# Residual error value
sigmaValues <- 1.36

# Parameter names
parameterNames <- c(names(parameterValues), "sigmaAdd")

#Fixed parameters = 0 not fixed = 1
notFixedParameters<- c(1,1,0,1,1,1,1,1)

#Names of the not fixed parameters for naming RSE afterwards,
#TRUE is added at the end to keep the sigma name
notFixedParameterNames <-
  parameterNames[c(as.logical(notFixedParameters),TRUE)]

#Number of different groups of "individuals" (here corresponds to
  number of conc
numberOfGroups <- 7

#How many individuals per group
nPerGroup <- 5

#Sampling times
samplingTimes <- c(0,3,8,13,20,24)

#### PopED functions ####
# define the initial conditions and the dosing
ff.model <- function(model_switch, xt, parameters, poped.db){
  with(as.list(parameters),{
    times_xt <- xt
    data <-
      dplyr::data_frame(ID = 1,
        time = sort(unique(c(times_xt))),
        amt = 0,
        cmt = 0,
        evid = 0,
        Log10Inoc = parameters[["Log10Inoc"]],
        kg = parameters[["kg"]],
        kd = parameters[["kd"]],
        Bmax = parameters[["Bmax"]],
        Emax = parameters[["Emax"]],
        EC50S = parameters[["EC50S"]],
        EC50R = parameters[["EC50R"]],
        mutf = parameters[["mutf"]],
        C=parameters[["C"]])

    out <- mrgsim(model, data=data)
    y <- out$BTOT
    y=y[match(times_xt,out$time)]
```

```

        y=cbind(y)
        return(list(y=matrix(y,ncol=1),poped.db=poped.db))
    })
}

# parameter definition function
# names match parameters in function ff
fg <- function(x,a,bpop,b,bocc){
  parameters=c( Log10Inoc=bpop[1],
  kg=bpop[2],
  kd=bpop[3],
  Bmax=bpop[4],
  Emax=bpop[5],
  EC50S=bpop[6],
  EC50R=bpop[7],
  mutf=bpop[8],
  C=a[1])
  return( parameters )
}

# Error function definition
feps.add.log10 <- function (model_switch, xt, parameters, epsi,
  poped.db)
{
  returnArgs <- do.call(poped.db$model$ff_pointer, list(model_switch,
  xt, parameters, poped.db))
  y <- returnArgs[[1]]
  poped.db <- returnArgs[[2]]
  y = 10^(log10(y) + epsi[, 1])
  return(list(y = y, poped.db = poped.db))
}

#Create a function that given a sigma value returns the determinant of
  the FIM
# of the simulated model
calculate.FIM.det <- function(sigma)
{
  #' create poped database
  poped.db <- create.poped.database(ff_fun="ff.model",
  fError_fun="feps.add.log10",
  fg_fun="fg",
  m=numberOfGroups,    #number of groups
  groupsize=nPerGroup,
  a=covariatesForEachGroup,
  sigma=sigma,
  bpop=parameterValues,
  notfixed_bpop=notFixedParameters,
  xt=samplingTimes,
  minxt=0,

```

```
maxxt=lastTimePoint)

FIM <- evaluate.fim(poped.db)

determinant <- det(FIM)

return(list(determinant))
}

#Create a vector of different sigma values
sigma <- exp(seq(-7, -1, by = 1))

#Create a dataframe associating the det(FIM) for each sigma value
sigmaVsDeterminantData <- data.frame("Sigma" = sigma,
"Determinant" = unlist(lapply(sigma, function(X)
calculate.FIM.det(X)[[1]])))

#Create a function that calculates the log of a value but returns
-1000 when the
# said value is negative
negative.value.from.log <- function(x)
{
  if(x>0)
  {
    return(log(x))
  }
  else
  {
    return(-1000)
  }
}

#Plot log(sigma) vs log(det(FIM)) to evaluate the structural
  identifiability
logDetVsLogSigmaPlot <- ggplot(sigmaVsDeterminantData, aes(x =
  log(Sigma), y =
  sapply(Determinant,function(X)negative.value.from.log(X)))) +
geom_point() +
geom_line()+
scale_x_continuous(name="log(sigma^2)",
limits=c(-7, -1),breaks=seq(-7, -1,by=1))+
scale_y_continuous(name="log(FIM-determinant)")+
theme_bw()
```

Annexe B

Modèle PD *in vitro* final

B.1 Code NONMEM du modèle

```

;; 1. Based on: 9
;; 2. Description: Persisters-2 subpop-Effet PMB Emax
;; x1. Author: Vincent ARANZANA-CLIMENT
;; 3. Label:
$PROBLEM Colistin on P. aeruginosa ATCC2710106 in vitro modeling
$INPUT ID TIME CMT CONC AMT EVID DV LLOQ MDV REP=DROP
$DATA ..\data\dataset_Pyo_CST.csv IGNORE=@
$SUBROUTINE ADVAN13 TOL=9
$MODEL COMP=(SENSI) ; Susceptible bacteria (CFU/mL)
COMP=(PERSISTS) ; Susceptible Persistent bacteria (CFU/mL)
COMP=(RESIS) ; Resistant bacteria (CFU/mL)
COMP=(PERSISTR) ; Resistant Persistent bacteria (CFU/mL)
$PK
TVLGINOC=THETA(1) ; Initial bacterial density (log10(CFU/mL))
TVKG= THETA(2) ; Bacterial growth rate constant (1/h)
TVKD = THETA(3) ; Bacterial death rate constant (1/h)
TVLGBMAX=THETA(4) ; Bacterial count in the stationary phase (CFU/mL)
TVMUTF = THETA(5) ; Frequency pre-existing resistant population
(log10())

TVEMAXS = THETA(6) ; Maximal achievable kill rate constant by colistin
for the susceptible population (1/h)
TVEMAXR = THETA(7) ; Maximal achievable kill rate constant by colistin
for the resistant population (1/h)
TVEC50S = THETA(8) ; Colistin concentration that produces 50% of Emax
for the susceptible population (mg/L)
TVEC50R = THETA(9) ; Colistin concentration that produces 50% of Emax
for the resistant population (mg/L)

LGINOC = TVLGINOC
KG = TVKG
KD = TVKD
LGBMAX = TVLGBMAX
MUTF = TVMUTF

```

```

EMAXS = TVEMAXS
EMAXR = TVEMAXR
EC50S = TVEC50S
EC50R = TVEC50R

A_0(1) = 10**LGINOC * (1-10**MUTF) ; Amount of susceptible bacteria at
      time = 0
A_0(2) = 0 ; Amount of susceptible persistent bacteria at time = 0
A_0(3) = 10**LGINOC * 10**MUTF ; Amount of resistant bacteria at time
      = 0
A_0(4) = 0 ; Amount of resistant persistent bacteria at time = 0

$DES

BTOT = A(1)+A(2)+A(3)+A(4)

DADT(1) = KG*A(1) - KD*A(1) - (KG-KD) * ((BTOT)/(10**LGBMAX)) * A(1) -
      ((EMAXS*CONC)/(EC50S+CONC))*A(1)
DADT(2) = -KD * A(2) + (KG-KD) * ((BTOT)/(10**LGBMAX)) * A(1)
DADT(3) = KG*A(3) - KD*A(3) - (KG-KD) * ((BTOT)/(10**LGBMAX)) * A(3) -
      ((EMAXR*CONC)/(EC50R+CONC))*A(3)
DADT(4) = -KD * A(4) + (KG-KD) * ((BTOT)/(10**LGBMAX)) * A(3)

$ERROR
A1=A(1)
A2=A(2)
A3=A(3)
A4=A(4)

LOQ=LOG10(200)

;IF(A1<1e-6) A1=1e-6
;IF(A3<1e-6) A3=1e-6

IPRED = LOG10(A1+A2+A3+A4)

IRES = DV-IPRED

W= SQRT(SIGMA(1)) ;; additive error on log10 scale

IWRES = IRES/W

IF(LLOQ.EQ.1) THEN ;For calculating NPDE of BLOQ data via NONMEM
DV_LOQ=LOQ
ENDIF

IF(MDV.EQ.1) THEN ;To avoid calculating CWRES, WRES for MDV data
MDVRES=1

```

```

ENDIF

;Sim_start
IF (LLOQ.EQ.0.OR.NPDE_MODE.EQ.1) THEN
F_FLAG=0
;Sim_end
Y = IPRED + EPS(1)
;Sim_start
ENDIF

IF (LLOQ.EQ.1.AND.NPDE_MODE.EQ.0) THEN ;BEAL M3 Method
F_FLAG=1
DUM=(LOQ-IPRED)/W
CUMD=PHI(DUM) ;; PHI = cumulative density function
Y = CUMD
ENDIF
;Sim_end

$THETA (0,6.01953,10) ; LGINOC Initial bacterial density
(log10(CFU/mL))
(0,1.65131,100) ; KG Bacterial growth rate constant (1/h)
(0,0.179,100) FIX ; KD Bacterial death rate constant (1/h)
(0,9.51845,100) ; LGBMAX Bacterial count in the stationary phase
(log10(CFU/mL))
(-10,-5.64973,0) ; MUTF Frequency pre-existing resistant population
(log10())
(0,6.13695,100) ; EMAXS Maximal achievable kill rate constant by
colistin for the susceptible population (1/h)
(0,1.75649,100) ; EMAXR Maximal achievable kill rate constant by
colistin for the resistant population (1/h)
(0,0.33268,100) ; EC50S Colistin concentration that produces 50% of
Emax for the susceptible population (mg/L)
(0,0.880445,100) ; EC50R Colistin concentration that produces 50% of
Emax for the resistant population (mg/L)
$OMEGA 0 FIX
$SIGMA 0.555509 ; SigmaAdd on log10scale
$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION LAPLACIAN MAXEVAL=9999 SIGDIG=3
SIGL=9 SIGLO=9 PRINT=5 NOABORT POSTHOC
$COVARIANCE PRINT=E UNCONDITIONAL
;Sim_start

;$SIM (12345) (54321)

;Sim_end
$TABLE ID TIME DV CMT MDV EVID IPRED CONC A1 A2 A3 A4 BTOT IWRES
LLOQ
CWRES NPD NPDE W NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab10

```

Annexe C

Modèle PK *in vivo* final

C.1 Code NONMEM du modèle

```
;; 1. Based on: 3
;; 2. Description: Modele Absorption Lineaire, Elimination Saturable
;; x1. Author: Vincent ARANZANA-CLIMENT
```

```
$PROBLEM
$DATA      ..\data\dataPKinVivoNatural.csv IGNORE=@
$INPUT      ID ID2 TIME AMT RATE EVID DV MDV CMT POSO LLOQ
$SUBROUTINE ADVAN13 TOL=9
$MODEL      NCOMP=2 COMP=(DEPO) ;Subcutaneous compartment
            COMP=(CENT) ;Central compartment
$PK
TVVMA = THETA(1) ;Typical value VMA
TVCL_max = THETA(2) ;Typical value CL_max
TVA50_CL = THETA(3) ;Typical value A50_CL
TVVD = THETA(4) ;Typical value Vd

VMA = TVVMA
CL_max = TVCL_max
A50_CL = TVA50_CL
VD = TVVD

$DES

DADT(1)= -VMA*(A(1))
DADT(2)= VMA*(A(1)) - CL_max*(A(2)/(VD)) / (A50_CL + (A(2)/VD))

$ERROR

A1=A(1)
A2=A(2)
LOQ= 0.030 ; ; LOQ = 0.030 mg/L

IPRED = A2/(VD)
```

```

IRES=DV-IPRED
W= SQRT(SIGMA(1)*IPRED**2+SIGMA(2)) ; combined error model
IWRES=IRES/W

IF(LLOQ.EQ.1) THEN ;For calculating NPDE of BLOQ data via NONMEM
DV_LOQ=LOQ
ENDIF

IF(MDV.EQ.1) THEN ;To avoid calculating CWRES, WRES for MDV data
MDVRES=1
ENDIF

;Comments "sim_start" and "sim_end" are for the -flip_comments of PsN
  vpc command
;It enables us to run vpc without re-writing the model file
;Sim_start
IF (LLOQ.EQ.0.OR.NPDE_MODE.EQ.1) THEN
F_FLAG=0
;Sim_end
Y=IPRED+IPRED*EPS(1)+EPS(2)
;Sim_start
ENDIF

IF (LLOQ.EQ.1.AND.NPDE_MODE.EQ.0) THEN
F_FLAG=1
DUM=(LOQ-IPRED)/W
CUMD=PHI(DUM) ;; PHI = cumulative density function
Y = CUMD
ENDIF
;Sim_end

$THETA (0,2.9) ; 1.VMA 1/h
(0,4.22514) ; 3.CL_max mg/h/kg
(0,4.36865) ; 4.A50_CL mg/L
(0,0.901479) ; 5.VD L/kg
$OMEGA 0 FIX
$SIGMA 0.192185 ; Prop residual
$SIGMA 0.0056241 ; Add residual
$ESTIMATION METHOD=1 SIGDIG=3 SIGL=9 SIGLO=9 MAXEVAL=99999 PRINT=1
NUMERICAL LAPLACIAN POSTHOC
$COVARIANCE PRINT=E UNCONDITIONAL
;Sim_start

;$SIM (12345) (54321)

;Sim_end
$TABLE      ID TIME IPRED IRES IWRES CWRES NPD NPDE W LLOQ MDV NOPRINT

```

ONEHEADER FILE=sdtab3

Annexe D

Analyse d'identifiabilité structurelle du modèle *in vitro* final

D.1 Code C++ du modèle

```

$PROB
- Author: Vincent Aranzana-Climent
- Date: 26/09/18
- Structure: PD : 2 sous populations, 2 fonctions emax
  - PK : Absorption non saturable, elimination saturable, 1
    compartiment
- Implementation: ODE
- Error model:
- Random effects: None
$PARAM @annotated
ka : 2.90 : First-order absorption rate constant (1/h)
CL_e_sat : 4.27 : Maximum rate for saturable elimination (mg/h/kg)
C50_CL_sat : 4.21 : Plasma concentration at half-maximum of saturable
  elimination (mg/L)
Vc : 0.848 : Central volume of distribution (L/kg)
Log10Inoc : 4.19 : Initial bacterial density (log10(CFU/mL))
kg : 0.788 : Bacterial growth rate constant (1/h)
kd : 0.179 : Bacterial death rate constant (1/h)
Bmax : 3.47*10^6 : Bacterial count in the stationary phase (CFU/mL)
EmaxS : 6.14 : Maximal achievable kill rate constant by colistin for
  the susceptible population (1/h)
EmaxR : 1.76 : Maximal achievable kill rate constant by colistin for
  the resistant population (1/h)
EC50S : 0.333 : Colistin concentration that produces 50% of Emax for
  the susceptible population (mg/L)
EC50R : 0.88 : Colistin concentration that produces 50% of Emax for
  the resistant population (mg/L)
mutf : -5.65 : frequency pre-existing resistant population (log10())
fu : 0.084 : Unbound colistin fraction
C : 0 : Colistin concentration (mg/L)
$CMT @annotated
DEPOT : Colistin amount in depot compartment (mg/kg)

```

```

CENTRAL : Colistin amount in central compartment (mg/kg)
SENSI : Susceptible bacteria (CFU/mL)
PERSISTS : Susceptible Persistent bacteria (CFU/mL)
RESIST : Resistant bacteria (CFU/mL)
PERSISTR : Resistant Persistent bacteria (CFU/mL)
$MAIN
SENSI_0 = pow(10,Log10Inoc) * (1 - pow(10,mutf)) ;
RESIST_0 = pow(10,Log10Inoc) * (pow(10,mutf)) ;
$ODE
double CCENTRAL = (CENTRAL/Vc);
dxdt_DEPOT = -ka * DEPOT;
dxdt_CENTRAL = ka * DEPOT - (CL_e_sat*CCENTRAL)/(C50_CL_sat+CCENTRAL);
double CEFF = CCENTRAL*fu;
double BTOT = SENSI + PERSISTS + RESIST + PERSISTR ;
dxdt_SENSI = kg*SENSI - kd*SENSI - (kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) * SENSI -
  (EmaxS*CEFF/(EC50S+CEFF))*SENSI;
dxdt_PERSISTS = -kd * PERSISTS + (kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) * SENSI;
dxdt_RESIST = kg*RESIST - kd*RESIST - (kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) *
  RESIST - (EmaxR*CEFF/(EC50R+CEFF))*RESIST;
dxdt_PERSISTR = -kd * PERSISTR + (kg-kd) * (((BTOT)/Bmax)) * RESIST;
$CAPTURE @annotated
DEPOT : Colistin amount in depot compartment (mg/kg)
CCENTRAL : Colistin concentration in central compartment with residual
  (mg/L)
SENSI : Susceptible bacteria (CFU/mL)
PERSISTS : Susceptible Persistent bacteria (CFU/mL)
RESIST : Resistant bacteria (CFU/mL)
PERSISTR : Resistant Persistent bacteria (CFU/mL)
BTOT : Total number of bacteria (CFU/mL)

```

D.2 Code R pour simuler et tracer les graphiques

```

library(mrgsolve)
library(dplyr)
library(ggplot2)

#### mrgSolve parameters ####

#Read the model file
model <- mread("ModelePKPDfinal",end=30,delta=0.1)

#Declare last time point to be simulated
lastTimePoint <- 30 #in hours

simulatedData <- model%>%knobs(amt=c(0,10,20,30), cmt=1)%>%as.tbl

```

```
colnames(simulatedData)[12] <- "POS0"

data <- read.csv("PDInVivo.csv")

cst_conc <- c("0"="Temoin",
"10"="10 mg/kg",
"20"="20 mg/kg",
"30"="30 mg/kg")

Predplot<- ggplot(data,(aes(TIME,DV)))+
facet_wrap(~POS0,ncol=2,
labeller=as_labeller(cst_conc))+
scale_y_continuous(name="Densite bacterienne pulmonaire
log10(CFU/mg)")+
scale_x_continuous(name="Temps post dose (heures)")+
geom_line(data=simulatedData, aes(x=time,
y=log10(BTOT)),size=1,color="steelblue")+
geom_point()+
geom_hline(aes(yintercept=log10(37.5)))+
theme_bw()+
coord_cartesian(ylim=c(0,8))+
theme(legend.position="none")

ggsave("PRED-InVivo-PD.png",Predplot,device="png",width=6.7,height=6.28,dpi=450,units="in")
```

Bibliographie

- [1] Jian Li, Roger L. Nation, John D. Turnidge, Robert W. Milne, Kingsley Coulthard, Craig R. Rayner, and David L. Paterson. Colistin : the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(9) :589–601, September 2006.
- [2] Roger L. Nation, Jian Li, Otto Cars, William Couet, Michael N. Dudley, Keith S. Kaye, Johan W. Mouton, David L. Paterson, Vincent H. Tam, Ursula Theuretzbacher, Brian T. Tsuji, and John D. Turnidge. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B : the Prato polymyxin consensus. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(2) :225–234, February 2015.
- [3] Sophie de Bentzmann and Patrick Plésiat. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology*, 13(7) :1655–1665, July 2011.
- [4] P. A. Lambert. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(Suppl 41) :22–26, 2002.
- [5] Stuart B. Levy and Bonnie Marshall. Antibacterial resistance worldwide : causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10 :S122–S129, November 2004.
- [6] Elisabet I. Nielsen and Lena E. Friberg. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacological Reviews*, 65(3) :1053–1090, July 2013.
- [7] Matthieu Jacobs, Nicolas Grégoire, William Couet, and Jurgen B. Bulitta. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. *PLoS Computational Biology*, 12(3), March 2016.
- [8] Phillip J. Bergen, Alan Forrest, Jürgen B. Bulitta, Brian T. Tsuji, Hanna E. Sidjabat, David L. Paterson, Jian Li, and Roger L. Nation. Clinically Relevant Plasma Concentrations of Colistin in Combination with Imipenem Enhance Pharmacodynamic Activity against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11) :5134–5142, January 2011.
- [9] Jürgen B. Bulitta, Jenny C. Yang, Liliana Yohonn, Neang S. Ly, Silvia V. Brown, Rebecca E. D’Hondt, William J. Jusko, Alan Forrest, and Brian T. Tsuji. Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of *Pseudomonas aeruginosa* Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5) :2051–2062, May 2010.

- [10] Ji-Young Lee, Young Kyoung Park, Eun Seon Chung, In Young Na, and Kwan Soo Ko. Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6 :25543, 2016.
- [11] Ami F. Mohamed, Otto Cars, and Lena E. Friberg. A pharmacokinetic/-pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5) :1350–1361, January 2014.
- [12] Meindert Danhof, Elizabeth C. M. de Lange, Oscar E. Della Pasqua, Bart A. Ploeger, and Rob A. Voskuyl. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling in translational drug research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(4) :186–191, April 2008.
- [13] Ami F. Mohamed, Ilias Karaiskos, Diamantis Plachouras, Matti Karvanen, Konstantinos Pontikis, Britt Jansson, Evangelos Papadomichelakis, Anastasia Antoniadou, Helen Giamarellou, Apostolos Armaganidis, Otto Cars, and Lena E. Friberg. Application of a Loading Dose of Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients : Population Pharmacokinetics, Protein Binding, and Prediction of Bacterial Kill. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8) :4241–4249, August 2012.
- [14] Matthieu Boisson, Matthieu Jacobs, Nicolas Grégoire, Patrice Gobin, Sandrine Marchand, William Couet, and Olivier Mimosz. Comparison of Intrapulmonary and Systemic Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate (CMS) and Colistin after Aerosol Delivery and Intravenous Administration of CMS in Critically Ill Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12) :7331–7339, January 2014.
- [15] Matti Karvanen, Christer Malmberg, Pernilla Lagerbäck, Lena E. Friberg, and Otto Cars. Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11) :e00857–17, November 2017.
- [16] William A. Craig, Jay Redington, and Steven C. Ebert. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(suppl_C) :29–40, January 1991.
- [17] D. Andes and W. A. Craig. In Vivo Activities of Amoxicillin and Amoxicillin-Clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* : Application to Breakpoint Determinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9) :2375–2379, September 1998.
- [18] Elisabet I. Nielsen, Anders Viberg, Elisabeth Löwdin, Otto Cars, Mats O. Karlsson, and Marie Sandström. Semimechanistic Pharmacokinetic/-Pharmacodynamic Model for Assessment of Activity of Antibacterial Agents from Time-Kill Curve Experiments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1) :128–136, January 2007.
- [19] Nathalie Q. Balaban, Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, and Stanislas Leibler. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*, 305(5690) :1622–1625, September 2004.

- [20] Jeffrey J. Campion, Philip Chung, Patrick J. McNamara, William B. Titlow, and Martin E. Evans. Pharmacodynamic Modeling of the Evolution of Levofloxacin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6) :2189–2199, June 2005.
- [21] Stuart L. Beal. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 28(5) :481–504, October 2001.
- [22] Soon-Ee Cheah, Jiping Wang, Van Thi Thu Nguyen, John D. Turnidge, Jian Li, and Roger L. Nation. New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection models : smaller response in lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(12) :3291–3297, December 2015.
- [23] Ilias Karaiskos, Lena E. Friberg, Konstantinos Pontikis, Konstantinos Ioannidis, Vasiliki Tsagkari, Lamprini Galani, Eirini Kostakou, Fotini Baziaka, Charalambos Paskalis, Antonia Koutsoukou, and Helen Giamairellou. Colistin Population Pharmacokinetics after Application of a Loading Dose of 9 MU Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12) :7240–7248, December 2015.
- [24] V. Shivva, J. Korell, I. G. Tucker, and S. B. Duffull. An approach for identifiability of population pharmacokinetic pharmacodynamic models. *CPT : Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2(6) :e49, jun 2013.
- [25] Joakim Nyberg, Sebastian Ueckert, Eric A. Stroemberg, Stefanie Hennig, Mats O. Karlsson, and Andrew C. Hooker. Poped : An extended, parallelized, nonlinear mixed effects models optimal design tool. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 108, 2012.
- [26] Marco Foracchia, Andrew C. Hooker, Paolo Vicini, and A. Ruggeri. Poped, a software for optimal experiment design in population kinetics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 74, 2004.
- [27] R Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.
- [28] Emmanuelle Comets, Karl Brendel, and France Mentré. Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models : The npde add-on package for R. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 90(2) :154–166, May 2008.
- [29] Thi Huyen Tram Nguyen, Emmanuelle Comets, and France Mentré. Extension of NPDE for evaluation of nonlinear mixed effect models in presence of data below the quantification limit with applications to HIV dynamic model. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 39(5) :499–518, October 2012.
- [30] C. E. Bonferroni. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. In *Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni*, pages 13–60. Rome University Press, Roma, 1935.

- [31] O. Mats Karlsson and Nick Holford. A tutorial on visual predictive checks. In *PAGE 17*, 2008.
- [32] Anne-Gaëlle Dosne, Martin Bergstrand, Kajsa Harling, and Mats O. Karlsson. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 43(6) :583–596, December 2016.
- [33] Lars Lindbom, Pontus Pihlgren, and Niclas Jonsson. PsN-toolkit—a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 79(3) :241–257, sep 2005.
- [34] Benjamin Guiastron, Andrew C. Hooker, Sebastian Ueckert, Mike K. Smith, and Mats O. Karlsson. *xpose : diagnostics for pharmacometric models*, 2018.
- [35] Kyle T. Baron, Alan C. Hindmarsh, Linda R. Petzold, Bill Gillespie, Charles Margossian, Devin Pastoor, and Metrum Research Group L.L.C. *mrgsolve : Simulate from ode-based population pk/pd and systems pharmacology models*, 2018.
- [36] Hadley Wickham. *ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.
- [37] J. Guedj, R. Thiébaud, and D. Commenges. Practical identifiability of HIV dynamics models. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69(8) :2493–2513, jun 2007.
- [38] A. C. Atkinson, A. N. Donev, and R. D. Tobias. *Optimum Experimental Designs, with SAS*. OXFORD UNIV PR, 2007.
- [39] Cornelia B. Landersdorfer, Jiping Wang, Veronika Wirth, Ke Chen, Keith S. Kaye, Brian T. Tsuji, Jian Li, and Roger L. Nation. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of systemically administered polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae* in mouse thigh and lung infection models. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2) :462–468, February 2018.
- [40] Pradeep K. Singh, Amy L. Schaefer, Matthew R. Parsek, Thomas O. Moninger, Michael J. Welsh, and E. P. Greenberg. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407(6805) :762–764, October 2000.
- [41] Johnny X. Huang, Mark A. T. Blaskovich, Ruby Pelingon, Soumya Ramu, Angela Kavanagh, Alysha G. Elliott, Mark S. Butler, A. Bruce Montgomery, and Matthew A. Cooper. Mucin Binding Reduces Colistin Antimicrobial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10) :5925–5931, October 2015.
- [42] Sebastian Kirchner, Joanne L. Fothergill, Elli A. Wright, Chloe E. James, Eilidh Mowat, and Craig Winstanley. Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. *Journal of Visualized Experiments*, (64), jun 2012.

Résumé

Dans ce travail, des time-kill curve *in vitro* ont été réalisées et un modèle semi-mécanistique a été développé à partir des résultats. Ensuite, une expérience PK/PD de "time-kill curve *in vivo*" sur un modèle de souris immuno-déprimées ayant une infection pulmonaire, a été réalisée et un modèle PK a été développé à partir des données de colistinémie plasmatique. Ces deux modèles ont ensuite été combinés afin de simuler l'évolution de la densité bactérienne attendue dans l'expérience *in vivo* puis les simulations ont été comparées aux données réellement observées.

Les simulations sur-estimaient l'effet de la colistine et nous avons émis trois hypothèses sur les raisons de cette sur-estimation, toutes liées à particularités des infections pulmonaires.

Ce résultat nous montre que même si la modélisation mathématique des données PK/PD nous permet théoriquement de faire des extrapolations à des situations non testées expérimentalement, une certaine prudence est de mise dans l'interprétation de ces extrapolations.

Mots clés : Pharmacocinétique, Pharmacodynamie, Pharmacométrie, Modélisation mathématique, Extrapolation, *in vitro*, *in vivo*, Antibiotique, Colistine, *Pseudomonas aeruginosa*

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De ne jamais oublier** ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En aucun cas**, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent** leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé** de mes confrères si j'y manque.

## Résumé

Dans ce travail, des time-kill curve *in vitro* ont été réalisées et un modèle semi-mécanistique a été développé à partir des résultats. Ensuite, une expérience PK/PD de "time-kill curve *in vivo*" sur un modèle de souris immuno-déprimées ayant une infection pulmonaire, a été réalisée et un modèle PK a été développé à partir des données de colistinémie plasmatique. Ces deux modèles ont ensuite été combinés afin de simuler l'évolution de la densité bactérienne attendue dans l'expérience *in vivo* puis les simulations ont été comparées aux données réellement observées.

Les simulations sur-estimaient l'effet de la colistine et nous avons émis trois hypothèses sur les raisons de cette sur-estimation, toutes liées à particularités des infections pulmonaires.

Ce résultat nous montre que même si la modélisation mathématique des données PK/PD nous permet théoriquement de faire des extrapolations à des situations non testées expérimentalement, une certaine prudence est de mise dans l'interprétation de ces extrapolations.

Mots clés : Pharmacocinétique, Pharmacodynamie, Pharmacométrie, Modélisation mathématique, Extrapolation, *in vitro*, *in vivo*, Antibiotique, Colistine, *Pseudomonas aeruginosa*