

## Modélisation de la dynamique de l'hématopoïèse normale et pathologique

### Modelling the dynamics of normal and pathological haematopoiesis

Mostafa Adimy<sup>1,2</sup>  
Samuel Bernard<sup>1,3</sup>  
Jean Clairambault<sup>1,4</sup>  
Fabien Crauste<sup>1,3</sup>  
Stéphane Génieys<sup>1,3</sup>  
Laurent Pujot-Menjouet<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ARC INRIA ModLMC<sup>1</sup>

<sup>2</sup> INRIA-Bordeaux, équipe-projet ANUBIS, Institut de mathématiques de Bordeaux, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

<sup>3</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5208,

Institut Camille Jordan, Bâtiment du Doyen Jean Braconnier, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex  
<lpmenjouet@yahoo.fr>

<sup>4</sup> INRIA-Rocquencourt, équipe-projet BANG, Domaine de Voluceau, BP 105, 78153 Le Chesnay Cedex

**Résumé.** Cet article présente différents modèles mathématiques décrivant l'évolution au cours du temps des populations de cellules hématopoïétiques. Il passe en revue les modèles compartimentaux sans retard, les modèles à retard de type prolifération-quiescence, les modèles stochastiques nécessaires pour décrire la prolifération dans le cas de tissus constitués de faibles nombres de cellules, et les modèles spatialisés de type équations aux dérivées partielles ou systèmes multi-agents. Quatre exemples sont développés : l'étude des aspects périodiques de l'hématopoïèse physiologique, l'étude de la leucémie myéloïde chronique qui fait intervenir toutes les lignées cellulaires, la modélisation spatiale qui décrit la compétition pour l'espace dans la moelle osseuse, et l'étude des rétro-contrôles et de l'autorenouveaulement des progéniteurs pour l'érythropoïèse de stress. L'utilisation de certains de ces modèles pour décrire les traitements en onco-hématologie et leur optimisation théorique est aussi discutée. Enfin, des perspectives de développements ultérieurs à l'intersection d'autres disciplines (darwinisme cellulaire, biologie systémique) sont présentées.

**Mots clés :** modèle mathématique, hématopoïèse, hémopathies, hématotoxicité

**Abstract.** To be able to predict quantitatively onco-haematological treatment outcomes, cell population models must first accurately describe the qualitative dynamics of blood cell production, i.e. the time evolution properties for the cell populations – equilibrium, extinction, oscillation or unlimited growth. Here, we review and present examples of various cell population mathematical models for haematopoiesis. Thirty years ago, a deterministic mathematical model of haematopoiesis was proposed in which a stem cell population is divided into a proliferating and a quiescent fraction [1]. From the four parameters — the rate of entry into proliferation, the duration of the proliferative phase and the rate of loss (apoptosis) for the proliferative phase and for the quiescent phase (differentiation) – an increase in apoptosis was sufficient to explain the observed oscillations in reticulocyte numbers in haemolytic anaemia. Subsequent models were developed to explain particular dynamics in other diseases (reviewed in [5]).

Despite the success of simple, deterministic models, new problems, especially in onco-haematology, call for different modelling frameworks. Stochastic models use the probabilistic nature of the fate of blood cells – death, differentiation, mutation – to characterize the structure of the haematopoietic system [16, 17]. These models are useful to study the dynamics of rare events (mutations) occurring in small stem cell populations [19]. Compartment models address specific questions related to haematotoxicity of various drugs, in the sense that they do not aim at explaining the origin or the dynamics of the diseases but at quantitatively predicting therapeutic outcomes of these drugs [20, 21]. Spatial models of the bone marrow are being developed to help understanding the role of cell movement and space competition

in oncogenesis. These spatial models can be reaction-diffusion equations [28] or multi-agent, individual-centered models [33].

Last, four examples of applications of mathematical models in haematopoiesis are developed: periodic physiological haematopoiesis; chronic myeloid leukaemia; spatial competition within the bone marrow; and feedback regulation and self-renewal in the erythroid lineage after stress.

**Key words:**  **hematopoiesis** **Merci de traduire les mots clés en anglais**

**A**vant toute autre chose, dissipons ici une possible équivoque : nous ne présentons pas des méthodes statistiques de traitement des données cliniques ni des méthodes de pharmacodynamie populationnelle appliquées à l'hématologie. Certes, nous entendons bien l'une des préoccupations de nombreux biologistes et médecins praticiens, qui est de tirer du sens d'une grande quantité de données de plus en plus complexes, et pour cela de faire appel à des modèles théoriques. Cette préoccupation est surtout sensible en hématologie où la variété des lignées cellulaires, des voies de contrôle de la prolifération au niveau moléculaire et des pathologies qui résultent en clinique de leurs dérèglements est particulièrement importante.

Mais autant des méthodes statistiques permettent de répondre à des questions simples à partir de données décrites par un petit nombre de variables quantitatives, autant elles sont inappropriées quand on cherche à comprendre la nature de phénomènes dynamiques tels que la neutropénie cyclique ou l'explosion de prolifération qui survient lors d'une crise blastique, par exemple. Et c'est bien le premier but qu'on est en droit d'assigner à une représentation théorique de la prolifération des lignées sanguines : qu'elle soit capable de rendre compte de différents types d'évolution observés expérimentalement du nombre de ces cellules, lignée par lignée, avec le temps.

Avant de pouvoir prédire quantitativement le comportement des populations de cellules cibles des traitements en onc-hématologie, il faut représenter de manière adéquate la dynamique, c'est-à-dire l'évolution au cours du temps, de ces populations, qu'elles soient normales ou proliférant de manière incontrôlée. Par « représentation adéquate », on entend un ensemble d'équations dont les solutions sont capables de reproduire des propriétés qualitatives remarquables des populations de cellules observées, décrites par leur nombre, telles que la capacité à passer d'un état stationnaire stable à un état oscillant ou d'aller vers l'extinction ou au contraire une croissance illimitée de la population.

L'analyse mathématique des modèles ainsi constitués permet en retour de déterminer les conditions, portant sur les paramètres du modèle, dans lesquelles une population de cellules doit se trouver pour qu'on puisse observer un phénomène

donné, et donc de faire de la prédiction qualitative sur le comportement de cette population.

Si, de plus, on sait représenter dans ces mêmes modèles théoriques l'action d'un ou plusieurs médicaments comme un contrôle externe appliqué sur l'une des variables, alors on peut approcher de manière rigoureuse le problème de l'optimisation thérapeutique des traitements qui visent, en onc-hématologie, à l'élimination des cellules anormales, en fonction de contraintes liées aux effets non désirés des médicaments : toxicité pour les cellules saines, induction de résistances.

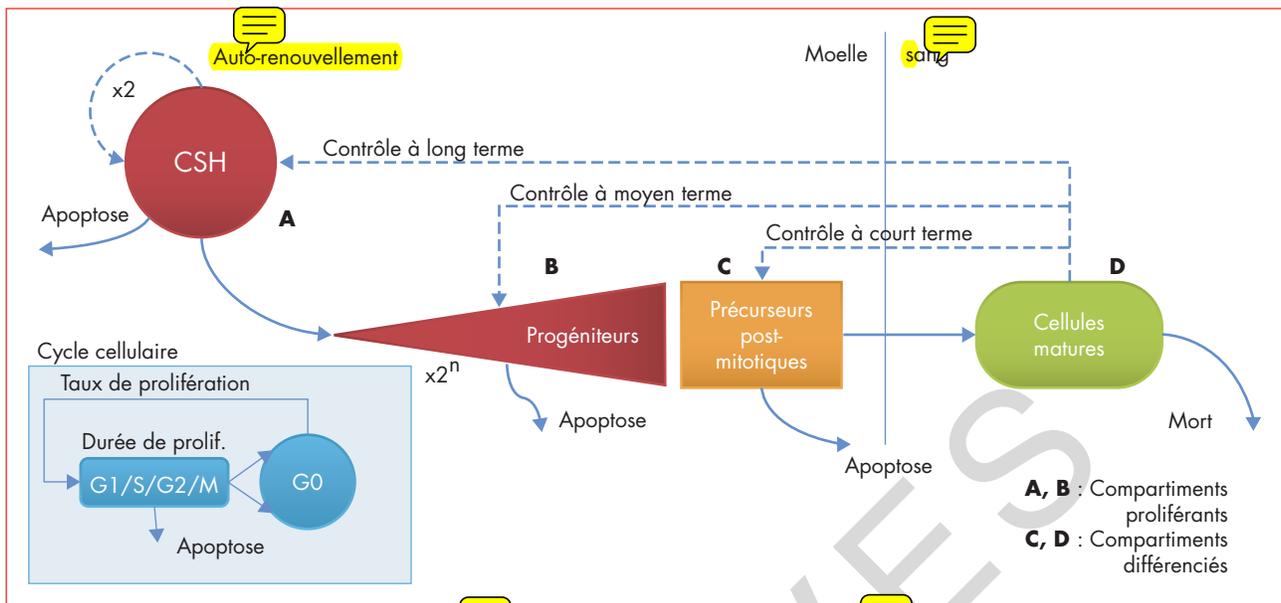
## Bref historique

En 1978, Mackey [1] a proposé le premier modèle décrivant la dynamique d'une population de cellules souches hématopoïétiques, et l'a appliqué notamment à l'étude de l'anémie aplasique et de l'hématopoïèse périodique. Ce modèle s'inspire de travaux antérieurs de Lajtha [2] et Burns et Tannock [3]. Il considère deux populations de cellules immatures, l'une proliférante et l'autre quiescente, dont la dynamique est caractérisée par un taux d'apoptose (pour les cellules en prolifération), un taux de passage de la phase quiescente à la phase proliférante, la durée moyenne d'un cycle cellulaire, et un taux de différenciation des cellules (*figure 1*).

L'origine de l'anémie aplasique est localisée dans le compartiment des cellules souches, et l'étude réalisée par Mackey [1] lie l'apparition d'oscillations lors de l'hématopoïèse principalement à une augmentation de l'apoptose des cellules en prolifération. D'autres désordres hématologiques, présentant des données cliniques oscillantes, ont été répertoriés et étudiés par Mackey [4] grâce au modèle développé dans sa précédente étude. Une revue récente des maladies hématologiques présentant des oscillations de certains types cellulaires, parmi lesquelles la neutropénie cyclique, et l'intérêt d'une modélisation mathématique pour leur compréhension a été réalisée par Haurie *et al.* [5].

Le modèle initialement proposé par Mackey pour décrire la dynamique des cellules souches hématopoïétiques a été modifié de nombreuses fois afin de prendre en compte l'évolution des connaissances sur l'hématopoïèse et ses mécanismes. Un modèle d'érythropoïèse a par exemple été proposé par Bélair *et al.* [6] en 1995, mais il ne tenait pas compte du rôle essentiel de l'érythropoïétine sur le contrôle de l'apoptose mis en évidence par Koury et Bondurant [7] en

<sup>1</sup> <http://www.math.u-bordeaux1.fr/~adimy/modlmc/>



**Figure 1.** Schéma des modèles d'hématopoïèse. Le compartiment A : des cellules souches qui sont capables soit d'autorenouvellement, soit de mourir par apoptose. Les progéniteurs (compartiment B) peuvent mourir ou se différencier vers le compartiment C des précurseurs. Leur nombre est multiplié par  $2^n$  (n divisions en 2 cellules filles) et ne tient pas compte de l'apoptose, car toutes les cellules dans ce compartiment peuvent s'autorenouveler. Dans le compartiment C, les précurseurs ne font que poursuivre leur maturation, sans se diviser. Ils ne peuvent que mourir ou atteindre la circulation sanguine (compartiment D). C'est le compartiment D qui influence à court, moyen ou long terme chacun des compartiments précédents par des boucles de régulation (en pointillés).

En 1990, la leucopœsie a été modélisée par Mackey *et al.* [8] afin d'apporter une explication aux oscillations observées durant la neutropénie cyclique (exemple 1). Ce travail de modélisation a permis de proposer un protocole thérapeutique pour cette maladie [9]. Enfin, un domaine d'application particulièrement intéressant du modèle proposé par Mackey est l'étude de la leucémie myéloïde chronique (LMC), sous sa forme périodique (exemple 2). La périodicité temporelle du nombre de cellules, dont les neutrophiles, les réticulocytes, et les plaquettes, a été décrite par Fortin et Mackey [10]. La modélisation a permis de mettre en évidence certains dérèglements pouvant aboutir aux observations réalisées sur des patients atteints de LMC, dont une modification des taux d'apoptose [11] et des durées de prolifération [12]. Au début des années 1980, Loeffler et Wichmann [13] ont également proposé une modélisation de la dynamique des cellules souches hématopoïétiques, différente de celle de Mackey [1]. Ils ont considéré un modèle complet de l'hématopoïèse, comprenant un compartiment de cellules souches, un compartiment de progéniteurs, et un compartiment de cellules matures (en fait, uniquement des érythrocytes et des granulocytes). Les cellules matures contrôlent la dynamique des progéniteurs, et les progéniteurs contrôlent la dynamique des cellules souches. Leur objectif était de reproduire un nombre conséquent d'expériences (anémies par saignements, irradiations, etc.) afin de déterminer les valeurs de paramètres importants, tels que les taux de prolifération ou de mortalité des cellules hématopoïétiques. Un ouvrage édité

en 1985 par Wichmann et Loeffler [14] répertorie l'ensemble des résultats obtenus, tant du point de vue de la modélisation et des résultats expérimentaux, que du lien établi entre eux. Bien entendu, la connaissance de l'hématopoïèse et de ses mécanismes moléculaires de contrôle a évolué et les modèles proposés il y a plus de vingt ans ne permettent plus de répondre correctement aux problématiques actuelles. Ils apportent cependant des idées pertinentes sur les éléments essentiels d'une modélisation de l'hématopoïèse, et ont permis le développement de modèles plus adaptés à des problèmes de mieux en mieux identifiés en hématologie. Notamment, des modèles prenant en compte la structure spatiale de la moelle osseuse, et ses conséquences sur la dynamique des cellules hématopoïétiques ont été développés depuis les années 1990 (exemple 3).

## Modèles prolifération-quiescence

Ces modèles, qui visent à prédire l'évolution quantitative d'une population de cellules, sont fondés sur la représentation d'échanges entre une sous-population proliférante (engagée dans le cycle de division cellulaire) et une sous-population quiescente, cellules inactives, ou bien engagées dans un processus de différenciation. Les outils mathématiques les plus simples utilisés pour décrire ces échanges sont les équations différentielles ordinaires. Elles permettent d'explicitement l'évolution temporelle des sous-populations de

cellules. Les équations aux dérivées partielles sont un outil plus complexe, apportant en revanche plus d'informations, notamment en tenant compte de structures inhérentes aux populations. L'« âge », par exemple, est une structure classique, représentant le déroulement chronologique des événements moléculaires associés aux phases du cycle cellulaire (synthèse des cyclines et kinases cycline-dépendantes, duplication de l'ADN, formation du fuseau mitotique, etc.). On peut lui ajouter d'autres variables de structure, décrivant par exemple la maturation de la cellule dans sa lignée, depuis la cellule souche jusqu'à la cellule différenciée et fonctionnelle. De tels modèles ont été étudiés théoriquement de manière détaillée [15]. Mais étant donné qu'il est impossible, à notre connaissance, d'accéder expérimentalement à des marqueurs biologiques de ces variables de structure, âge ou maturité, et souvent d'identifier les paramètres de ces modèles, on peut moyenniser les équations en intégrant ces variables de structure pour ne garder que la dépendance en fonction du temps. L'intégration suivant les variables de structure fait alors apparaître des retards dans les nouvelles équations. Le modèle proposé par Mackey [1] en 1978 (figure 1), présenté ci-dessous, est un tel système d'équations à retard (la quantité de cellules  $Q(t-\tau)$ , prise à l'instant  $t-\tau$ , influence la dynamique du système à l'instant  $t$ ; son action est donc retardée d'une durée fixe  $\tau$ ) :

$$\begin{aligned} \frac{dP(t)}{dt} &= -\gamma P(t) + \beta(Q(t))Q(t) - \mu(Q(t-\tau))e^{-\gamma\tau}Q(t-\tau) \\ \frac{dQ(t)}{dt} &= -[\beta(Q(t)) + \delta]Q(t) + 2\beta(Q(t-\tau))e^{-\gamma\tau}Q(t-\tau) \end{aligned}$$

où  $P(t)$  et  $Q(t)$  sont respectivement les densités (ou nombres) de cellules à l'instant  $t$  dans les phases proliférante et quiescente,  $\tau$  représente la durée de la phase proliférante, c'est-à-dire la durée moyenne du cycle cellulaire,  $\gamma$  et  $\delta$  sont des taux de mortalité dans les phases proliférante et quiescente, respectivement, et  $\beta$  est une fonction « de réintroduction » de la phase quiescente vers la phase proliférante. Cette fonction est décroissante par rapport à la variable observable  $Q$  et représente l'inhibition de la prolifération par un grand nombre de cellules quiescentes. Si on admet que chaque cellule quiescente possède un nombre fixe de récepteurs pour les molécules régulatrices de la mitose, et que la disponibilité totale en ces molécules est constante dans la population des cellules, alors il est naturel, en notant  $k$  le taux maximal de réintroduction en phase proliférante, de donner à la fonction  $\beta$  la forme  $\beta(Q) = k\theta^n/(\theta^n + Q^n)$ . La sensibilité  $n$  aux variations de la population mesure le caractère coopératif de la formation des complexes ligands-récepteurs, et  $\theta$  est une valeur seuil [1].

Cette expression de la dynamique d'une population de cellules proliférantes sous forme d'un système à retard a été popularisée dans des travaux sur l'hématopoïèse physiologique et ses dérèglements (notamment dans les leucémies), en particulier par Mackey [1, 4] et ses collaborateurs [6, 8, 11].

## Compétition spatiale

La plupart des modèles de l'hématopoïèse existants sont formés par des systèmes d'équations de transport (à retard ou non, structurées ou non). Ce transport est alors celui des cellules d'un compartiment (ou un groupe de compartiments) vers un autre, avec une vitesse de vieillissement ou de maturation déterminée. Ces compartiments peuvent être décrits en détail ou non : le moins mature étant le compartiment des cellules souches, puis viennent les progéniteurs, etc. (figure 1).

La prise en compte du stroma médullaire et de la compétition entre cellules (saines ou pathologiques) au sein de cet espace, dans la modélisation de l'hématopoïèse, a fait jusqu'ici l'objet de peu d'attention et ceci pour deux raisons principales. La première est que la structure de la moelle est poreuse et extrêmement complexe à modéliser. La seconde découle du fait que peu d'expériences *in vivo* dans la moelle osseuse ont été réalisées, et donc la modélisation de l'apparition d'une cellule mutante, son développement et sa relation dynamique avec les autres cellules par exemple restent encore peu connus des biologistes.

Deux principales approches se détachent de ces études. La première est déterministe et continue, faisant intervenir des équations de réaction-diffusion dans les milieux poreux. La deuxième est stochastique et discrète. Il s'agit d'une approche par un modèle multi-agents, ou individu-centré. Un logiciel simule l'évolution et le comportement individuel des cellules dans la moelle selon des règles pré-établies. Ces deux approches sont illustrées dans l'exemple 3.

## Modèles stochastiques

Dans une série d'articles récents [16, 17], Dingli et Pacheco se sont placés dans un cadre stochastique pour décrire la progression dans la différenciation et la maturation des lignées hématopoïétiques humaines, depuis les cellules souches jusqu'aux cellules circulantes. Se fondant sur une loi physique d'invariance (« scaling allométrique ») d'une espèce de mammifère à l'autre, ils ont par exemple estimé le nombre de cellules souches hématopoïétiques actives chez l'humain. Ils ont également appliqué cette problématique à l'examen de la question de l'origine polyclonale de l'hémoglobulinurie paroxystique nocturne [18], et plus généralement à des considérations sur le risque de mutations lié à la taille du compartiment des cellules souches [19].

## Modèles compartimentaux

Friberg [20] et Panetta [21], tous deux en contact proche avec la clinique et concernés de façon primordiale par la représentation de la toxicité hématologique de médicaments anticancéreux (paclitaxel, étoposide, irinotecan, temozolomide entre autres), ont développé indépendamment des

modèles compartimentaux de l'hématopoïèse. Ces modèles ont en commun d'être linéaires dans la description des échanges entre compartiments, des cellules proliférantes de la moelle jusqu'aux polynucléaires neutrophiles circulants, avec une seule non-linéarité représentant (de manière différente du point de vue mathématique pour chacun d'eux) un rétro-contrôle négatif des cellules circulantes sur le taux de prolifération dans la moelle. Ces modèles, construits pour servir de base prédictive (quantitative) en clinique, ne prétendent pas à l'explication des désordres observés au cours des hémopathies, mais uniquement à la surveillance de l'hématotoxicité (sur une moelle saine) dans le traitement de tumeurs solides. Pour chaque médicament concerné, toujours supposé agir uniquement sur les cellules proliférantes de la moelle, une évaluation des paramètres du modèle est menée sur des populations de patients soit à l'aide du logiciel NONMEM (pour Friberg), soit en utilisant une méthode de moindres carrés implémentée dans MATLAB® (pour Panetta). Dans ce cadre, aucune explication des hémogrammes malins n'est donc apportée, mais il apparaît plutôt d'un grand intérêt pour la thérapeutique antitumorale pour le contrôle de l'hématotoxicité.

## Quatre exemples

### Hématopoïèse périodique physiologique

Environ  $10^{12}$  cellules de toutes les lignées sanguines sont remplacées chaque jour chez l'adulte. Si l'on admet que le corps humain compte  $10^{14}$  cellules, la production des cellules sanguines tient une place importante dans la régulation physiologique cellulaire générale. Le système hématopoïétique incorpore des voies de contrôle couplées qui assurent l'homéostasie (niveau stable de cellules) en temps normal et une réponse rapide lors de perturbations (stress). Ces deux fonctions, homéostasie et réactivité, ne sont pas totalement compatibles, ce qui peut donner lieu à des conflits. Un système trop sensible ne pourra pas maintenir un niveau constant de cellules, et une homéostasie trop stable ne réagira pas assez vite à des perturbations. D'une part, l'homéostasie est assurée par des boucles de rétro-contrôle négatives qui maintiennent les cellules en circulation à leur niveau de population optimal ; la chute de celui-ci provoque une augmentation de la production de nouvelles cellules et vice-versa. D'autre part, la rapidité d'adaptation, qui est cruciale, en particulier pour la réponse immunitaire, est assurée par un grand réservoir de progéniteurs dans la moelle. Lors d'une infection, le nombre de globules blancs en circulation doit pouvoir être fortement augmenté en l'espace de quelques heures. Ce réservoir de progéniteurs permet la libération de nouvelles cellules dans la circulation. En revanche, comme cette réserve s'épuise rapidement, une hématopoïèse continue est nécessaire. Trois éléments caractérisent donc le système hématopoïétique : 1) une production de cellules matures à partir de cellules souches, ce qui peut

prendre plusieurs jours, 2) une amplification du nombre de progéniteurs pour une réponse rapide, 3) des boucles négatives de régulation de cette production pour préserver l'homéostasie (figure 1).

La présence d'un retard dans ces rétro-contrôles négatifs dû au temps de maturation/prolifération fait qu'une fois le réservoir de progéniteurs épuisé, des oscillations peuvent apparaître dans le niveau de cellules en circulation. Plusieurs désordres hématopoïétiques comme la neutropénie, la thrombocytopenie, la polycythémie essentielle ou la leucémie myéloïde chronique ont des formes périodiques [5]. La diversité des désordres périodiques donne à penser que le système hématopoïétique possède en lui-même la capacité de générer ces oscillations, lorsque certains paramètres physiologiques sont dérégulés. En fait, des oscillations du niveau des globules blancs ont été observées chez des sujets sains [22] et peuvent être induites par des traitements [23], ce qui suggère que l'état naturel du système hématopoïétique se trouve à la limite de la zone homéostatique.

Une version simplifiée d'un modèle de contrôle cellulaire dû à Mackey [1] tient compte des cellules en circulation, à un niveau  $N(t)$ , qui sont éliminées à un taux  $a$  et sont produites à un taux  $P - bN(t - \tau)$ . Ici,  $P$  est le taux maximal de production (quand  $N = 0$ ), et la production décline à un rythme  $bN$  à mesure que le nombre de cellules augmente. Le terme de production dépend du passé,  $t - \tau$ , car la libération de cellules dans la circulation se fait après un temps de transit  $\tau$  (les équations sont données sur la figure 3). Si la force du contrôle  $b$  est petite, autrement dit si le système n'est pas très réactif, le nombre de cellules sera stable, mais mettra beaucoup de temps à s'ajuster après une perturbation (figure 3A, ligne bleue). En revanche, si  $b$  est grand, le système sera très réactif mais le nombre de cellules pourra présenter des oscillations soutenues (figure 3A, pointillés rouges) ou amorties (pointillés verts). Du point de vue du contrôle,  $b$  devrait être aussi grand que possible sans dépasser le seuil des oscillations soutenues pour assurer une réactivité optimale du système (figure 3B).

### Leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif chronique prédominant sur la lignée granulocytocytaire, lié à un processus monoclonal affectant une cellule souche très primitive. L'idée que la LMC est un cancer des cellules souches primitives est confortée par la présence du chromosome Philadelphie dans toutes les lignées de cellules sanguines, ainsi que par l'observation d'oscillations périodiques de tous les éléments figurés du sang chez certains patients atteints de LMC [10]. Il a été constaté depuis la fin des années 1960 [24] que la période de ces oscillations est la même pour toutes les lignées de cellules sanguines et qu'elle varie entre 40 et 80 jours. Cette période est très longue par rapport à la durée du cycle cellulaire, estimée à quelques heures. Le niveau des globules blancs peut varier entre 30 et  $200 \times 10^9$  cellules/L, alors que pour les plaquet-

tes et les globules rouges, les valeurs varient plutôt de normales à élevées. Comme cela a été souligné dans le paragraphe précédent, la LMC n'est pas la seule maladie hématologique présentant des oscillations. Bien que tous ces désordres périodiques semblent être causés par des mécanismes physiologiques similaires (dérèglement de certains paramètres), chaque pathologie a ses spécificités : périodes et amplitudes différentes, oscillations dans une ou plusieurs lignées, etc. [5, 25].

Des modèles mathématiques ont été développés pour expliquer l'apparition d'oscillations dans la LMC [11, 12]. Ils sont fondés principalement sur des équations différentielles à retard similaires à celles proposées par Mackey [1] présentées plus haut. Bien que les systèmes à retard soient moins précis que les équations aux dérivées partielles, ils permettent une meilleure appréhension des causes de la déstabilisation du système et permettent d'expliquer l'apparition de phénomènes oscillatoires. En particulier, Pujo-Menjouet *et al.* [11] ont montré dans un modèle de la LMC périodique l'existence d'oscillations avec de longues périodes. Ils ont également considéré un système d'équations différentielles à retard et ont cherché les conditions qui le déstabilisent pour faire apparaître des oscillations. Parmi les paramètres du système, ils ont déterminé ceux qui agissent sur la période ainsi que ceux qui agissent sur l'amplitude de ces oscillations. Leurs résultats indiquent que les taux de différenciation et d'apoptose contrôlent principalement la période, alors que le taux de prolifération et la durée du cycle cellulaire modifient l'amplitude. Dans ce premier travail, les auteurs se sont focalisés sur une seule lignée (globules blancs).

Un modèle plus général pour la LMC périodique a été introduit récemment par Colijn et Mackey [26] pour étudier l'origine des oscillations dans les trois lignées. Ces auteurs ont utilisé des données cliniques sur les polynucléaires neutrophiles, les réticulocytes et les plaquettes pour un échantillon de 11 patients atteints de LMC périodique. Leur modèle est un système de quatre équations différentielles à retard modélisant les cellules souches hématopoïétiques et les trois lignées citées précédemment. Ils ont montré que les principaux paramètres qui produisent ces oscillations et qui agissent ensuite sur la période et l'amplitude sont le taux d'apoptose des cellules souches, leur taux de différenciation en neutrophiles, et le taux d'amplification de la lignée des neutrophiles.

## Approches spatiales

### Modèles de réaction-diffusion avec convection

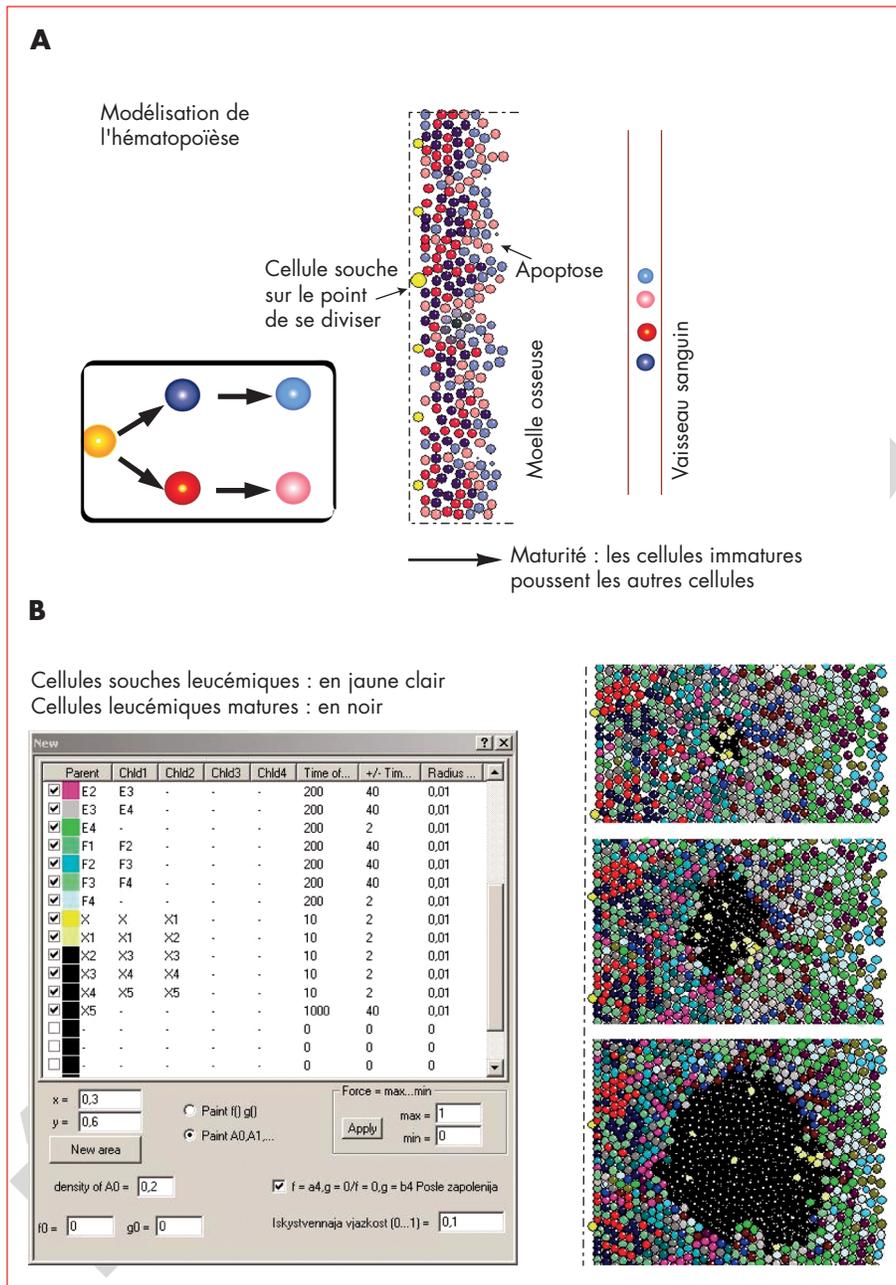
Des mouvements de cellules hématopoïétiques dans le stroma médullaire ont bien été observés [27] mais les mécanismes qui les régissent sont encore mal connus. Il est toutefois communément accepté que la capacité des cellules souches hématopoïétiques à se mouvoir joue un rôle crucial dans l'hématopoïèse et peut augmenter dans certaines pathologies ou sous l'action de certains traitements.

Bessonov *et al.* ont proposé [28] un modèle simplifié d'hématopoïèse leucémique qui tient compte du déplacement des

cellules dans le stroma. Deux effets ont été plus particulièrement considérés : la diffusion des cellules et la pression mécanique qui résulte des contacts entre ces dernières. Cette pression est modélisée en suivant la loi de Darcy pour les milieux poreux, qui relie la pression au champ des vitesses, et la diffusion décrit un mouvement aléatoire dans le stroma considéré comme un milieu homogène. Le modèle qui est ainsi proposé est un système de réaction-diffusion avec convection. Après une étude analytique et numérique du modèle, les auteurs se sont penchés sur l'influence de la diffusion sur le comportement à long terme du système. Ils ont mis en évidence l'existence d'un seuil de diffusion pour les cellules leucémiques en dessous duquel l'état normal du système perd sa stabilité au profit d'un état leucémique. Ce modèle a permis de montrer la compétition pour l'espace entre les cellules saines et les cellules leucémiques (même si le domaine poreux de la moelle osseuse a pour l'instant été considérablement simplifié). En cas de prolifération excessive, l'augmentation de la pression cellulaire qui peut être observée dans les simulations entraîne la libération de cellules immatures dans le système sanguin. D'autre part, des simulations récentes de ce modèle ont permis de représenter, jusqu'ici seulement qualitativement, l'action d'une chimiothérapie sur la vitesse de prolifération des cellules. Ceci permet d'augurer de bonnes pistes de recherche pour la compréhension et l'optimisation du traitement de la LMC par exemple.

### Modèles multi-agents

Une autre façon de modéliser l'intérieur de la moelle osseuse passe par la représentation d'une compétition pour l'espace entre cellules grâce à une approche multi-agents. Cette fois-ci, le modèle n'est plus continu mais discret, et une part de stochasticité est introduite dans les processus. Plusieurs modèles multi-agents ont été proposés, notamment par Pimentel [29], qui propose une interface simple fondée sur le modèle continu de Mackey et Glass [30]. Un autre modèle est proposé par Ramos (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/community/bloodcells>). D'autres modèles, plus spécifiques des cellules souches ou bien de structures spatiales différentes (comme les cellules de la crypte intestinale par exemple) ont été étudiés par D'Inverno *et al.* [31] ou bien Galle *et al.* [32]. Bessonov *et al.* ont récemment proposé [33] un nouveau modèle multi-agents principalement orienté vers l'étude de toutes les lignées de cellules dans la moelle osseuse avec la possibilité de compétition entre cellules saines et pathologiques (leucémiques par exemple). Ce logiciel (*figure 2*) offre une interface adaptée aux biologistes ainsi qu'aux cliniciens. Il permet ainsi de visualiser l'influence des différents paramètres impliqués dans le modèle sur la dynamique des cellules. Plusieurs cas de figure sont alors envisageables et observés dans les simulations : la persistance des cellules leucémiques (*figure 2*), leur disparition, ou bien l'apparition d'une forme chronique de la maladie, qui pourrait correspondre à la leucémie myéloïde chronique.



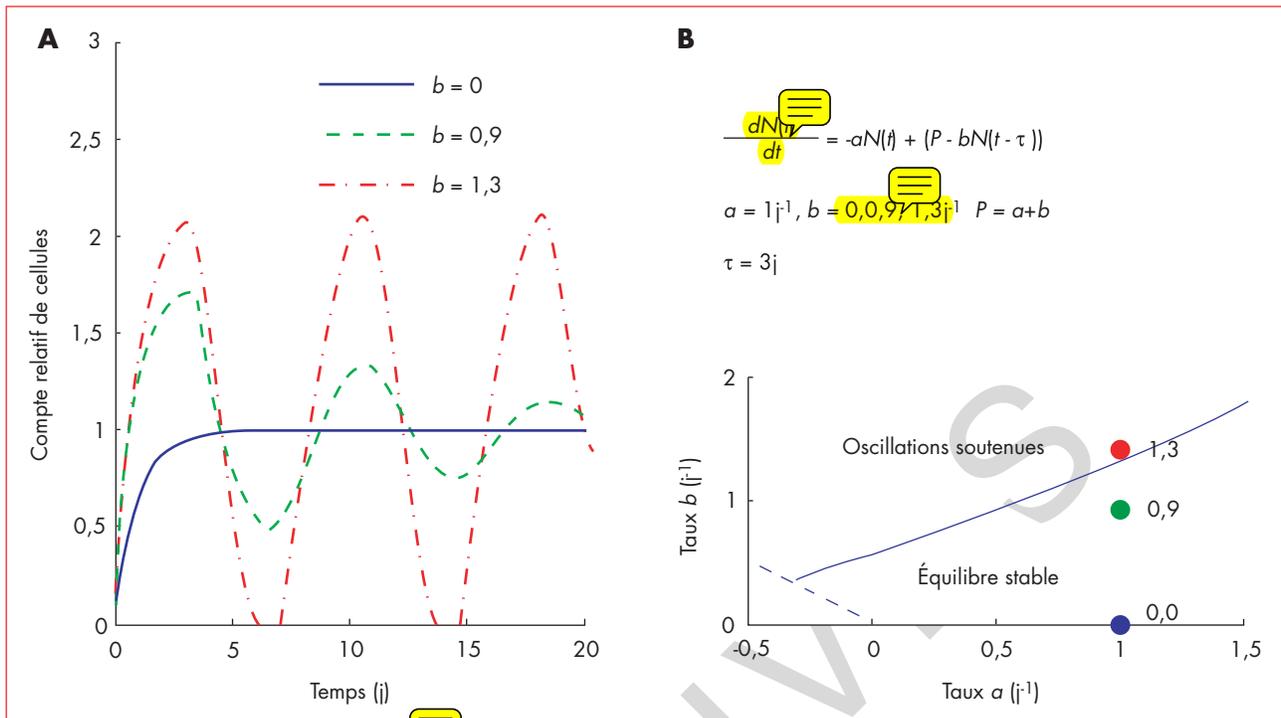
**Figure 2. A)** Exemple d'utilisation du logiciel conçu par Bessonov *et al.* [33]. Les disques jaunes représentent les cellules souches, les cellules bleues et rouges leurs descendants directs, et les couleurs plus claires les cellules de générations suivantes. Les cellules jaunes (souches) sont attachées à la paroi de gauche (paroi de la moelle osseuse), et toutes les autres cellules sont poussées vers la droite par division puis relâchées dans le système sanguin. **B)** Exemple de propagation de cellules leucémiques (noires) dans la moelle osseuse [33].

## Erythropoïèse de stress

L'autorenouvellement [34] est la capacité qu'a une cellule de produire, par division, deux cellules filles possédant le même niveau de maturité que leur cellule mère, tout en conservant la possibilité de s'engager dans un processus de différenciation. L'autorenouvellement est une propriété intimement liée aux cellules souches. Des études récentes [35, 36] ont cependant

mis en évidence de l'autorenouvellement chez des progéniteurs érythrocytaires, lors d'une érythropoïèse de stress.

Dans [37], un modèle d'érythropoïèse (normale et de stress) a été proposé afin d'établir l'importance de l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires dans la modélisation mathématique de l'érythropoïèse. Ce modèle a été confronté à des données expérimentales d'anémie chez la souris. Deux



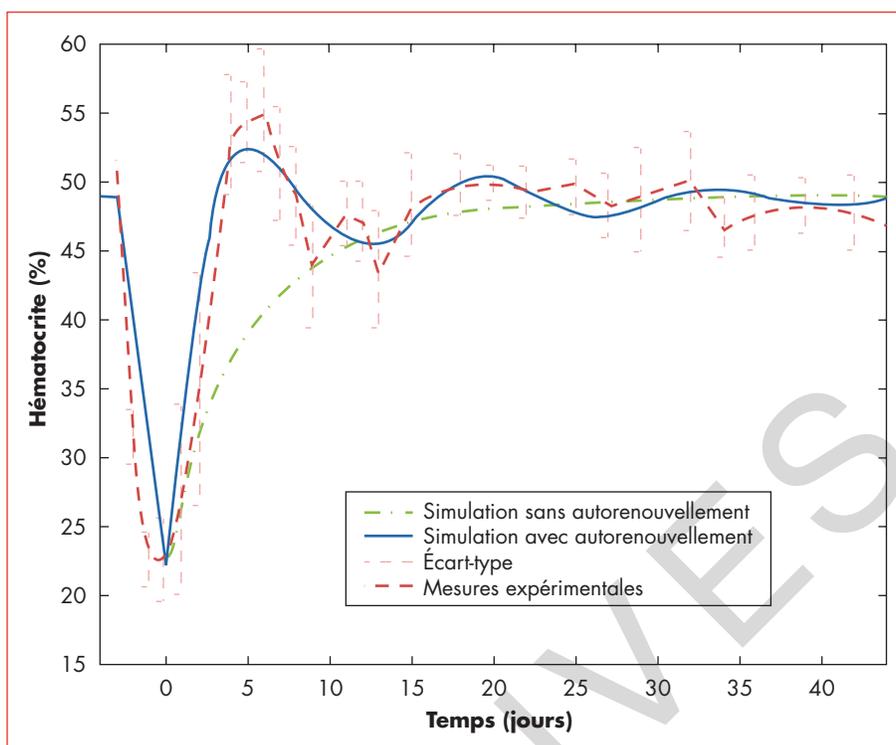
**Figure 3.** Homéostasie et réactivité. (Gauche) Suite à une perturbation, le nombre de cellules retourne à sa valeur stationnaire de façon monotone (ligne bleue,  $b = 0 \text{ j}^{-1}$ ), avec oscillations amorties (lignes vertes,  $b = 0,9 \text{ j}^{-1}$ ), ou oscille autour de sa valeur stationnaire (lignes rouges,  $b = 1,3 \text{ j}^{-1}$ ), selon la magnitude du contrôle  $b$ . (Droite) La stabilité du niveau de cellules dépend des paramètres  $a$  et  $b$  dans l'équation différentielle à retard décrivant la dynamique du niveau de cellules en circulation.

groupes de souris, composés chacun de six mâles et six femelles, ont été étudiés. Un des deux groupes n'a pas été anémié et a servi de contrôle. Le second a été anémié par deux injections intrapéritonéales de phénylhydrazine, à 24 heures d'intervalle. Pour chaque groupe, l'hématocrite a été mesurée à intervalles de temps réguliers (quotidiennement, à l'exception des dimanches, durant les 2 semaines suivant les injections, puis tous les 2 ou 3 jours, pour le groupe anémié, tous les 2 ou 3 jours pour le groupe de contrôle). La réponse à l'anémie provoquée par la phénylhydrazine est assez claire. L'hématocrite commence par chuter, jusqu'à atteindre des valeurs proches de 22 %, puis remonte rapidement, dépasse l'hématocrite normal (entre 45 et 50 %), puis rechute et se stabilise lentement autour de sa valeur moyenne (figure 4).

Le modèle mathématique considéré pour modéliser la réponse à cette anémie décrit l'évolution temporelle de deux populations de cellules : des progéniteurs et des érythrocytes matures. La dynamique des cellules souches n'est pas modélisée dans ce travail. Pour chaque population, on s'intéresse à la densité de cellules (cellules par gramme) dans le compartiment considéré (progéniteur ou érythrocyte). Un schéma décrivant les principaux mécanismes pris en compte dans ce modèle est présenté dans la figure 1.

Le compartiment des progéniteurs est alimenté avec un taux constant par des cellules souches (le flux est estimé à  $10^4$

cellules par gramme et par jour au maximum chez la souris). Chaque progéniteur s'autorenouvelle ou meurt par apoptose selon des taux contrôlés uniquement et directement par la population totale d'érythrocytes matures. Ces hypothèses présentent explicitement des contrôles en fait implicites de l'autorenouvellement et de l'apoptose des progéniteurs érythrocytaires par les érythrocytes, qui s'effectuent notamment à travers des facteurs de croissance tels que l'érythropoïétine, ou les glucocorticoïdes. Les érythrocytes agissent positivement sur l'apoptose [7] (plus il y a de globules rouges, plus l'apoptose des progéniteurs est importante), et négativement sur l'autorenouvellement [36]. La durée d'un cycle autorenouvelant est évaluée à 24 heures environ, alors que la durée totale de séjour dans le compartiment progéniteur (c'est-à-dire le temps pendant lequel une cellule peut être considérée comme un progéniteur) est évaluée à 4 jours. Il est à noter que maturation et amplification sont dissociées dans ce modèle, ce qui, bien sûr, ne reflète aucune réalité. Au bout de 4 jours, les progéniteurs deviennent des érythrocytes matures, qui meurent avec un taux constant (l'espérance de vie d'un érythrocyte chez la souris étant de 40 jours, le taux de mortalité est égal à  $1/40$  par jour). Les simulations réalisées ont montré que sans prendre en compte l'autorenouvellement de progéniteurs il n'était pas possible de reproduire les résultats expérimentaux, ce qui devenait en revanche possible en l'incorporant au modèle. Ceci est illustré par la figure 4.



**Figure 4.** Evolution de l'hématocrite de souris durant 44 jours. La ligne en pointillés correspond aux expériences d'anémie sur les souris (9 souris ont survécu sur les 12 ayant débuté l'expérience), l'écart-type est représenté de part et d'autre de chaque mesure expérimentale. La ligne continue correspond à la simulation effectuée en tenant compte de l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires, alors que la ligne semi-continue représente une simulation ne tenant pas compte de l'autorenouvellement. Les simulations démarrent au temps  $t = 0$ , et la chute de l'hématocrite induite par l'anémie est incluse dans la condition initiale du modèle, définie sur un intervalle de temps  $[-4, 0]$ .

Les résultats de ce modèle, obtenus grâce à une collaboration étroite entre biologistes et mathématiciens ont permis notamment de mettre en évidence une particularité liée au protocole expérimental. La phénylhydrazine détruit la membrane des érythrocytes, les rendant ainsi plus fragiles. Il s'ensuit que l'espérance de vie d'un érythrocyte mature est plus courte que la normale après une injection de phénylhydrazine. Cette réalité biologique a été mise en évidence dans le modèle : sans supposer une diminution de l'espérance de vie des érythrocytes, il n'était pas possible de reproduire par la simulation les résultats des expériences.

## Optimisation thérapeutique

Ce point a déjà été abordé plus haut à propos des travaux de Friberg *et al.* [20] et Panetta [21], sur la surveillance de la toxicité pour la moelle des traitements des tumeurs solides. Il faut remarquer pourtant que ces modèles n'abordent pas de front simultanément la représentation de l'efficacité antitumorale et de la toxicité non désirée pour les tissus sains. Ce dernier point de vue est en revanche développé par Basdevant et Clairambault [38, 39], dans le cas d'école d'un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique simple décrivant l'action d'un dérivé du platine sur une tumeur solide

murine sous-cutanée, avec une cible de toxicité intestinale au lieu de médullaire. Les méthodes d'optimisation sous contraintes utilisées dans ce cadre sont tout à fait transposables au cas d'autres médicaments cytotoxiques, et plus spécifiquement hématotoxiques.

Mais d'autres défis restent encore à relever pour optimiser théoriquement les traitements en onco-hématologie : représentation de l'association possible de plusieurs médicaments, prise en compte des mécanismes moléculaires d'action intracellulaire des médicaments (nécessaire dans le cas des polythérapies d'usage courant en clinique, reposant sur des molécules aux sites d'action et mécanismes variés), et enfin contrôle et prévention, non seulement de toxicités non désirées, mais aussi de l'apparition de clones de cellules résistantes aux traitements.

## Perspectives

Un autre point de vue nous semble susceptible de décrire de façon pertinente certains phénomènes centraux de l'hématopoïèse. Il s'agit de l'idée d'évolution darwinienne dans les populations cellulaires. Ce point de vue a été introduit par Kupiec [40] (modèle darwinien de la différenciation cellulaire), et développé dans différents contextes physiologiques

[41]. Un exemple typique de ce genre d'approche est le travail d'Atamas [42] qui décrit la façon dont une population de cellules indifférenciées est poussée à se différencier en deux branches de cellules morphologiquement distinctes, à cause des interactions entre cellules (compétition pour des signaux de croissance par exemple). La question du contrôle de la différenciation cellulaire est évidemment un point central de l'hématopoïèse normale et leucémique, et l'étude des effets de population sur ce contrôle semble importante. Néanmoins, les modèles mathématiques décrivant ces structurations darwiniennes de populations sont récents et demeurent abstraits [43, 44], et leur application dans le contexte de l'hématopoïèse reste à faire.

La biologie des systèmes (voir une présentation par exemple dans [45]) est une nouvelle discipline à la frontière de la biologie moléculaire, de l'informatique et des mathématiques, qui – à la différence des systèmes d'équations différentielles en nombre restreint évoqués jusqu'ici dans ce texte – a pour objet la représentation exhaustive des réactions biochimiques et des voies de signalisation à l'œuvre dans une cellule (ou dans un tissu) sans limitation de nombre des variables ni des paramètres. Cette approche peut ensuite se ramener par une réduction raisonnée du nombre de variables, en fonction d'un objectif déterminé (par exemple la représentation du métabolisme cellulaire d'un médicament donné) à un modèle limité à un petit nombre d'équations, plus accessibles à un traitement analytique.

Kitano a montré [46, 47] comment en biologie des systèmes des notions de robustesse et de fragilité pouvaient être utiles pour décrire le métabolisme cellulaire et pour aider à la conception de nouveaux médicaments. Ces outils d'analyse sont actuellement en plein développement [48], en particulier pour l'industrie pharmaceutique. Ils peuvent éclairer les succès spectaculaires par exemple de thérapies très ciblées comme le traitement par l'imatinib de la leucémie myéloïde chronique, mais devraient aussi permettre d'imaginer de nouvelles stratégies fondées sur des synergies médicamenteuses lorsqu'une seule molécule se révèle insuffisante (toxicité excessive ou apparition de résistances, par exemple).

## Conclusion

Nous avons esquissé dans cet article un panorama – non exhaustif – des modèles d'hématopoïèse normale et pathologique existants, ainsi que quelques travaux de modélisation pour l'optimisation des traitements. Il faut noter que même si une tradition déjà bien établie (> 30 ans) de tels modèles existe, leur confrontation aux problèmes d'explication et de prédiction de la dynamique des hémopathies rencontrés en clinique n'est sans doute pas encore suffisamment fréquente, même si beaucoup de progrès dans une coopération entre hématologues et mathématiciens ont été accomplis ces dernières années. Les mathématiciens, physiciens et informaticiens qui développent ces modèles de l'hématopoïèse souhaitent travailler plus encore sur des données expérimentales.

en interaction avec des hématologues ; les propositions d'explication de la dynamique des désordres de la prolifération et d'optimisation théorique éventuelle des traitements ne pourront que gagner en réalisme au développement de telles collaborations. C'est ce qui a été déjà entrepris depuis 2006 dans l'ARC INRIA ModLMC (<http://www.math.u-bordeaux1.fr/~adimy/modlmc/>). ■

## RÉFÉRENCES

1. Mackey MC. Unified hypothesis for the origin of aplastic anaemia and periodic hematopoiesis. *Blood* 1978 ; 51 : 941-56.
2. Lajtha LG. On DNA labeling in the study of the dynamics of bone marrow cell populations. In : Stohlmán Jr. F, ed. *The Kinetics of Cellular Proliferation*. New York : Grune and Stratton, 1959 : 173-82.
3. Burns FJ, Tannock IF. On the existence of a  $G_0$  phase in the cell cycle. *Cell Tissue Kinet* 1970 ; 19 : 321-34.
4. Mackey MC. Dynamic hematological disorders of stem cell origin. In : Vassileva-Popova JG, Jensen EV, eds. *Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition*. New York : Plenum Press, 1979 : 373-409.
5. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclical neutropenia and other periodic hematological diseases : A review of mechanisms and mathematical models. *Blood* 1998 ; 92 : 2629-40.
6. Bélair J, Mackey MC, Mahaffy JM. Age-structured and two-delay models for erythropoiesis. *Math Biosci* 1995 ; 128 : 317-46.
7. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990 ; 248 : 378-81.
8. Bernard S, Bélair J, Mackey MC. Oscillations in cyclical neutropenia : New evidence based on mathematical modeling. *J Theor Biol* 2003 ; 223 : 283-98.
9. Foley C, Bernard S, Mackey MC. Cost-effective G-CSF therapy strategies for cyclical neutropenia : Mathematical modeling based hypotheses. *J Theor Biol* 2006 ; 238 : 754-63.
10. Fortin P, Mackey MC. Periodic chronic myelogenous leukemia : Spectral analysis of blood cell counts and etiological implications. *Br J Haematol* 1999 ; 104 : 336-45.
11. Pujol-Menjouet L, Bernard S, Mackey MC. Long period oscillations in a  $G_0$ -model of hematopoietic stem cells. *SIAM J Appl Dynam Syst* 2005 ; 4 : 312-32.
12. Adimy M, Crauste F, Ruan S. A mathematical study of the hematopoiesis process with applications to chronic myelogenous leukemia. *SIAM J Appl Math* 2005 ; 65 : 1328-52.
13. Loeffler M, Wichmann HE. A comprehensive mathematical model of stem cell proliferation which reproduces most of the published experimental results. *Cell Tissue Kinet* 1980 ; 13 : 543-61.
14. Wichmann HE, Loeffler M. *Mathematical Modeling of Cell Proliferation*. Boca Raton, FL : CRC, 1985.
15. Adimy M, Crauste F. Global stability of a partial differential equation with distributed delay due to cellular replication. *Nonlinear Anal* 2003 ; 54 : 1469-91.
16. Dingli D, Traulsen A, Pacheco JM. Stochastic dynamics of hematopoietic tumor stem cells. *Cell Cycle* 2007 ; 6 : 461-6.
17. Dingli D, Pacheco JM. Ontogenic growth of the haemopoietic stem cell pool in humans. *Proc R Sci B* 2007 ; 274 : 2497-501.

18. Traulsen A, Dingli D, Pacheco JM. On the Origin of Multiple Mutant Clones in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 3081-4.
19. Lopes JV, Pacheco JM, Dingli D. Acquired hematopoietic stem-cell disorders and mammalian size. *Blood* 2007 ; 110 : 4120-2.
20. Friberg L, Henningsson A, Maas H, Nguyen L, Karlsson MO. Model of chemotherapy-induced with parameter consistency across drugs. *J Clin Oncol* 2002 ; 20 : 4713-21.
21. Panetta JC. A mechanistic model of temozolomide myelo-suppression in children with high-grade gliomas. *Math Biosci* 2003 ; 186 : 29-41.
22. Carulli G, Marini A, Azzara A, Vanacore R, Petrini M. Cyclic oscillations of neutrophils, monocytes, and CD8-positive lymphocytes in a healthy subject. *Haematologica* 2000 ; 85 : 447-8.
23. Bennett M, Grunwald AJ. Myeloproliferative Disorders Hydroxyurea and periodicity in myeloproliferative disease. *Eur J Haematol* 2001 ; 66 : 317-23.
24. Morley A, Baikie A, Galton D. Cyclic leukocytosis as evidence for retention of normal homeostatic control in chronic granulocytic leukaemia. *Lancet* 1967 ; 2 : 1320-2.
25. Santillan M, Bélair J, Mahaffy JM, Mackey MC. Regulation of platelet production : The normal response to perturbation and cyclical platelet disease. *J Theor Biol* 2000 ; 206 : 585-603.
26. Colijn C, Mackey MC. A mathematical model of hematopoiesis : I. Periodic chronic myelogenous leukemia. *J Theor Biol* 2005 ; 237 : 117-32.
27. Riviere C, Subra F, Cohen-Solal K, Cordette-Lagarde V, Letestu R, Auclair C, Vainchenker W, Louache F. Phenotypical and a functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood* 1999 ; 93 : 1511-23.
28. Bessonov N, Ducrot A, Volpert V. Modeling of leukemia development in the bone marrow. *Proc of the annual Symposium on Mathematics applied in Biology and Biophysics* 2005 ; Tome XLVIII, Vol. 2 : 79-88.
29. Pimentel J. Agent Based Model for the Production Mechanism and Control of Blood Cells in the Human Body. *Proceedings of The National Conference On Undergraduate Research (NCUR)*. The University of North Carolina at Asheville Asheville, North Carolina 2006.
30. Mackey MC, Glass L. *From clocks to chaos. The rhythms of life*. Princeton : Princeton University Press, 1988.
31. D'Inverno M, Saunders R. Agent-Based Modelling of Stem Cell Self-organisation in a Niche. *Lecture Notes in Computer Science, éditeur Springer Berlin/Heidelberg* 2005 ; ISSN 0302-9743(print), 1611-3349 (Online), Volume 3464/2005.
32. Galle J, Aust G, Schaller G, Beyer T, Drasdo D. Individual cell-based models of the spatio-temporal organisation of multicellular systems - achievements and limitations. *Cytometry* 2006 ; 69A : 704-10.
33. Bessonov N, Pujo-Menjouet L, Volpert V. Cell modelling of hemopoiesis. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena* 2007 ; ; (sous presse).
34. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden : stem cells and their niches. *Science* 2000 ; 287 : 1427-30.
35. Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schutz G, Beug H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2996-3002.
36. Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J. TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors : evidence for an autocrine mechanism. *EMBOJ* 1999 ; 18 : 2764-81.
37. Crauste F, Pujo-Menjouet L, Génieys S, Molina C, Gandrillon O. Adding Self-Renewal in Committed Erythroid Progenitors Improves the Biological Relevance of a Mathematical Model of Erythropoiesis. *J Theor Biol* 2008 ; 250 : 322-38.
38. Clairambault J. Modelling oxaliplatin drug delivery to circadian rhythm in drug metabolism and tolerance. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 ; 59 : 1054-68 ; (ADONIS).
39. Basdevant C, Clairambault J, Lévi F. Optimisation of time-scheduled regimen for anti-cancer drug infusion. *Mathematical Modelling and Numerical Analysis* 2005 ; 39 : 1069-86.
40. Kupiec JJ. A Darwinian theory for the origin of cellular differentiation. *Mol Gen Genet* 1997 ; 255 : 201-8.
41. Kupiec JJ, Sonigo P. *Ni Dieu ni gène. Pour une autre théorie de l'hérédité*. Paris : Editions du Seuil, 2000.
42. Atamas S. Self-organization in computer simulated selective systems. *Biosystems* 1996 ; 39 : 143-51.
43. Génieys S, Volpert V, Auger P. Adaptive dynamics : modelling Darwin's divergence principle. *C R Biol* 2006 ; 329 : 876-9.
44. Champagnat N, Ferrière R, Méléard S. Unifying evolutionary dynamics : From individual stochastic processes to macroscopic models. *Theor Popul Biol* 2006 ; 69 : 297-321.
45. Kitano H. Computational systems biology. *Nature* 2002 ; 420 : 206-10.
46. Kitano H. Cancer as a robust system : Implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 227-35.
47. Kitano H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2007 ; 6 : 202-10.
48. Westerhoff HV, Palsson BO. The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 1249-52.