

Préclinique, prérequis toxicologiques du dossier AMM, Modèles animaux

MASTER1
UE PHARMACOLOGIE
Février 2023

Dr David BOELS
Unité SPIN
Service de Santé Publique



PRODUITS DE SANTÉ

Médicaments

Produits sanguins

Produits dérivés du sang (facteur VIII purifié)

Produits de thérapie génique et cellulaire

Cosmétiques

Matériel médico-chirurgical

RECHERCHE EXPLORATOIRE

La Molécule

Par synthèse

A partir d'une chimiothèque

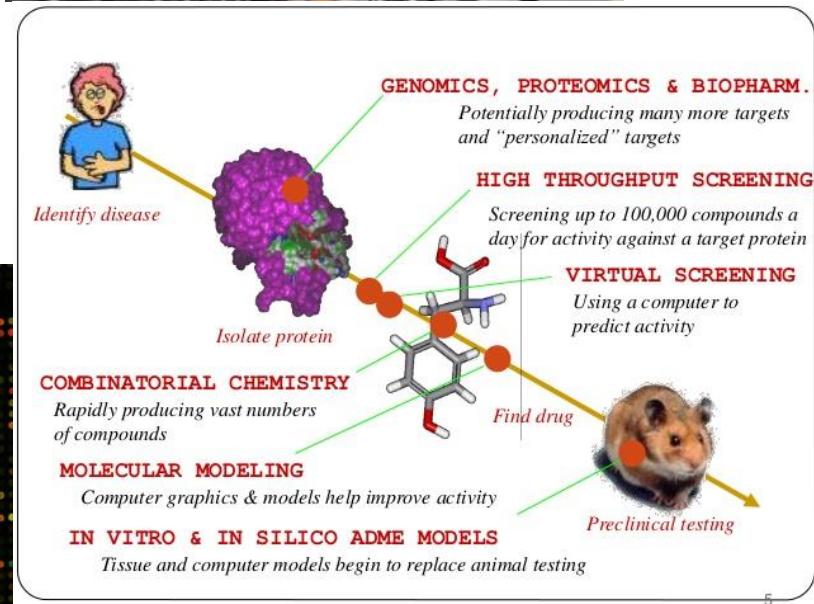
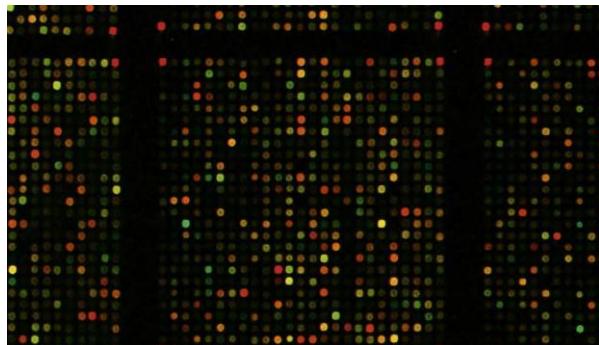
Par biotechnologie

Les Méthodes de Screening

in silico

in vitro

in vivo



DOSSIER GALÉNIQUE

DRUG PRODUCT = FORME PHARMACEUTIQUE

- Choix de la forme pharmaceutique
- Définition de la formule (excipients et leur compatibilité)
- Anticipation de la dose
- Méthodes analytiques de contrôle
- Conditionnement primaire et secondaire
- Spécifications
- Conditions de conservation; Stabilité/péremption
- Fabrication GMP



C'est quoi un candidat médicament ?

Molécule active sur un mécanisme capable de **modifier le cours d'une maladie**

et

qui réunit des propriétés physiques, chimiques et biologiques qui le rendent susceptible de progresser dans les étapes de développement préclinique et clinique jusqu'à **sa mise sur le marché**.

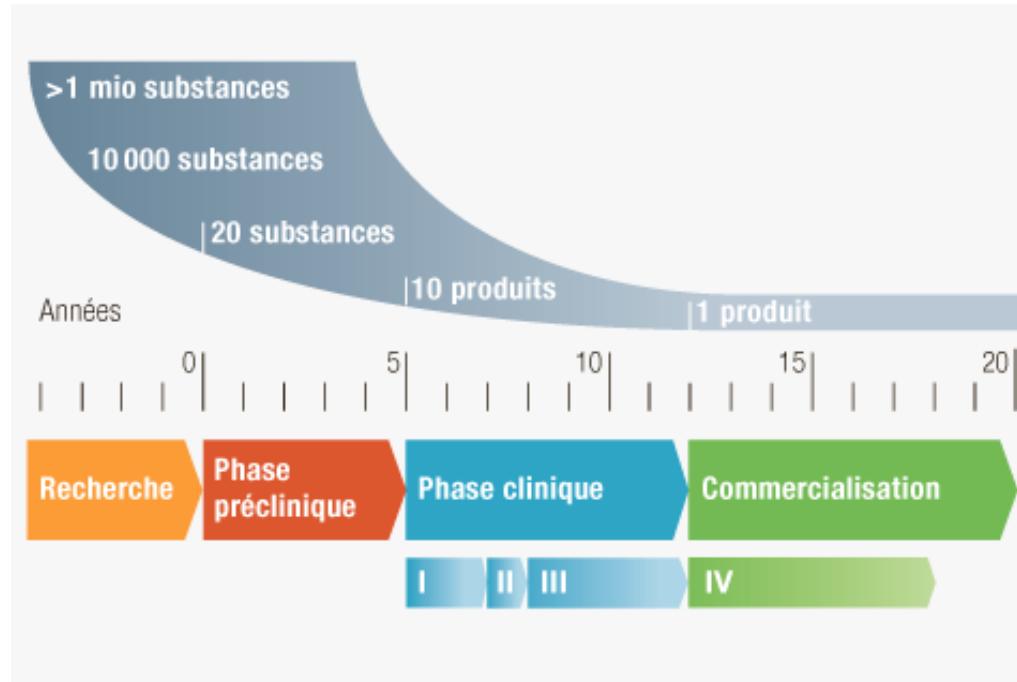
Avant d'être considéré « **Médicament** »

et obtenir l'Autorisation de Mise sur le Marché (A.M.M), un produit subit

Deux grandes étapes d'études:

- Études précliniques
- Études cliniques

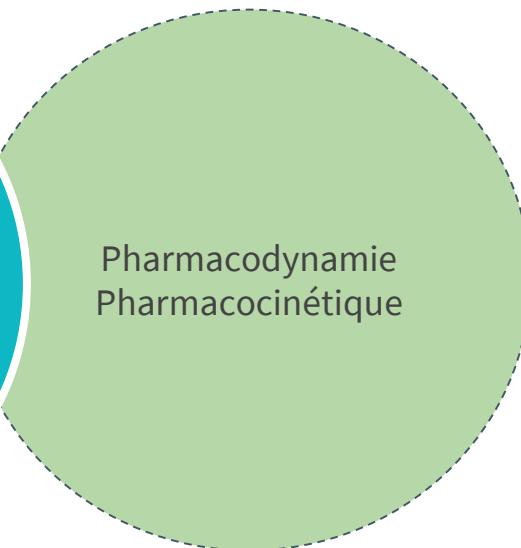
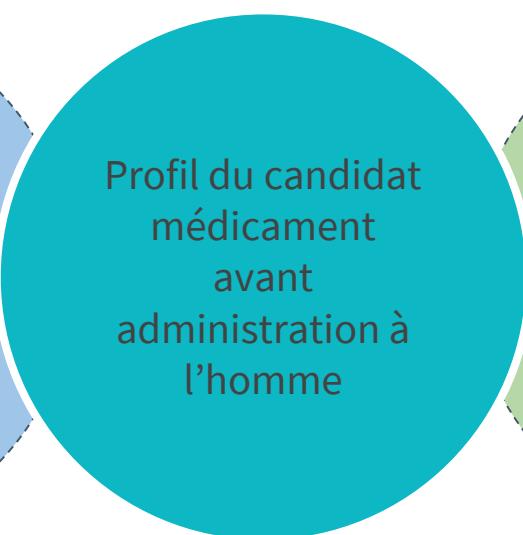
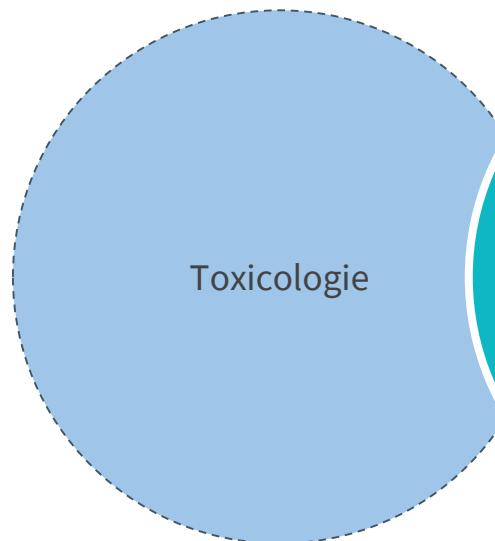
GENESE D'UN MEDICAMENT



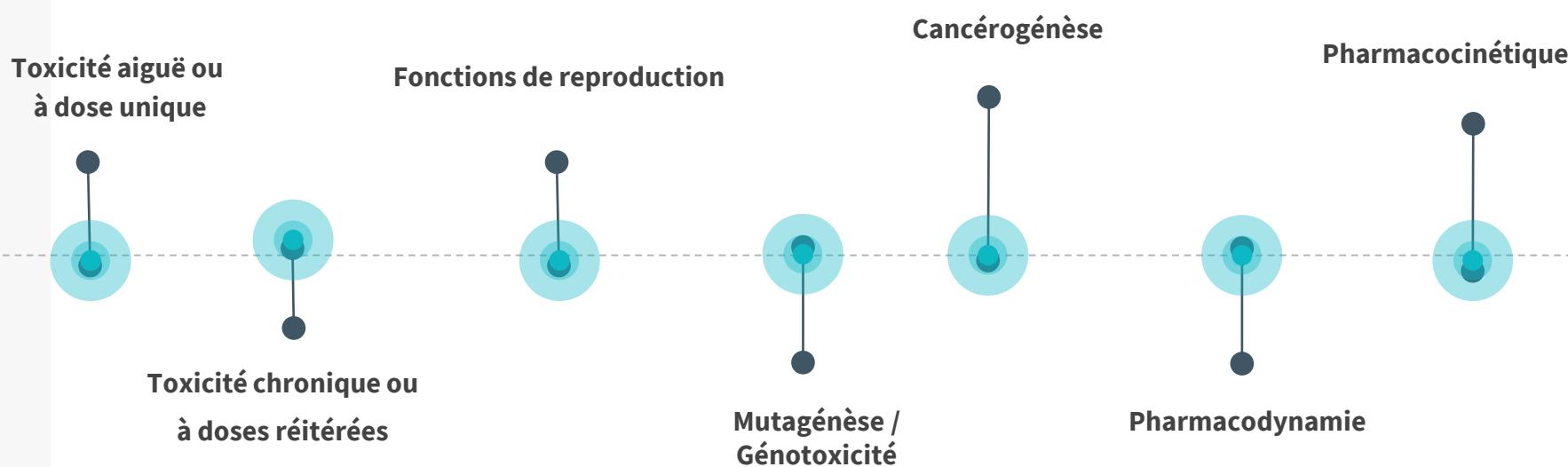
Principales causes d'arrêt du développement

- **Problèmes pharmaceutiques (solubilité, impuretés...) (14%)**
- **Problèmes pharmacocinétiques (métabolisme, absorption...) (30%)**
- **Toxicité (préclinique) (26%)**
- Pas d'efficacité en clinique (11%)
- Mauvaise tolérance en clinique (5%)
- Décision stratégique (marketing, concurrence...) (14%) Quand ?

OBJECTIFS DES ESSAIS PRÉCLINIQUES



LES DIFFÉRENTES ÉTAPES PRÉCLINIQUES



DOSSIER PHARMACOLOGIQUE

Dossier PK + PD (études PK/PD sur modèles cellulaires et animaux)

PD

les effets propres à la molécule (pharmacodynamie spécifique)

mise en évidence d'une relation effet-dose et effet-temps

détermination de la DE50 (dose entraînant 50% de l'effet maximum) en mg/kg

recherche du mécanisme d'action de la molécule

- les effets généraux
- les éventuelles interactions.



PK préclinique

caractériser la PK chez les espèces animales

ADME des médicaments (méthodes in vitro/in vivo)

But des études des prérequis toxicologiques

- **Toxicité lors de l'administration unique ou réitérée du produit**

- Définir les organes cibles
- Déterminer si les effets sont réversibles
- Doses sans effet
- Facteur de sécurité

- **Toxicité sur les fonctions de reproduction**

- Fertilité et capacité de reproduction
- Embryotoxicité et tératogenèse
- Péri- et post-natalité

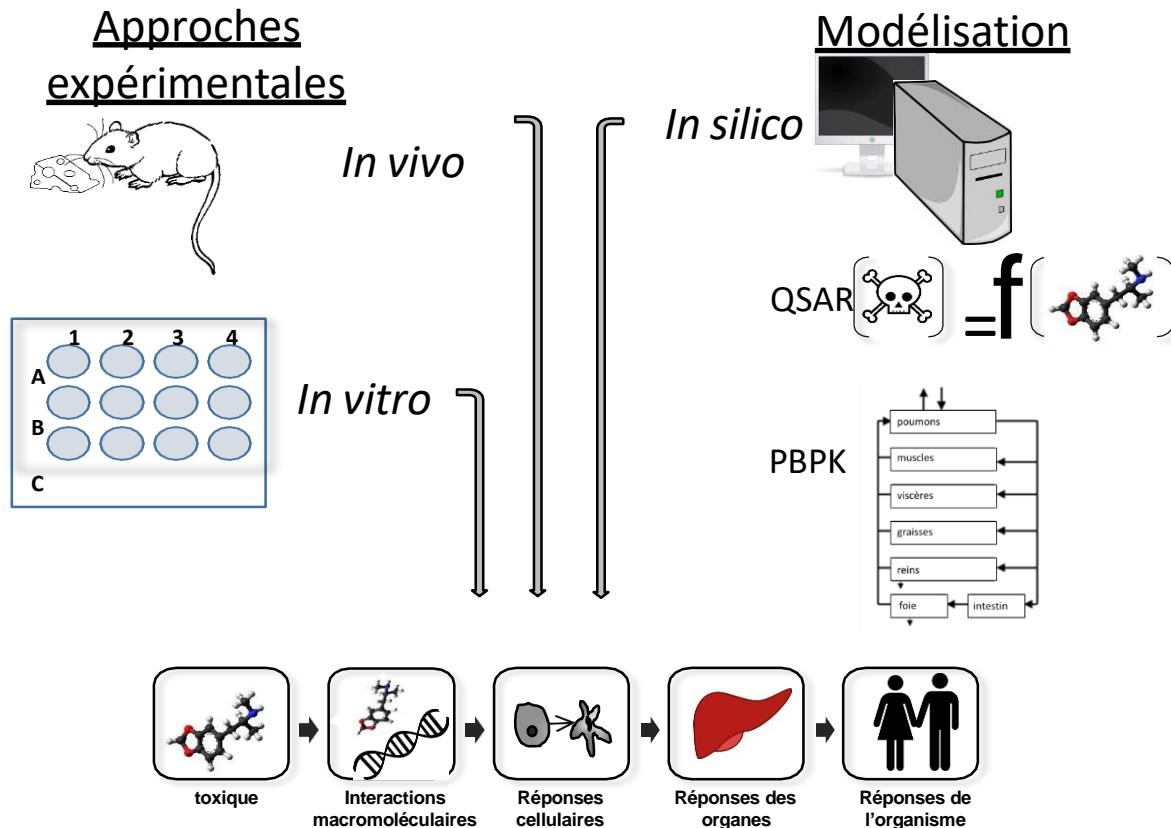
- **Pouvoir mutagène et cancérogène**

- **Autres toxicités**

- Tolérance locale
- Immunotoxicité

⇒ Réduire au maximum les risques liés aux premières expositions humaines

Evaluation de la toxicité

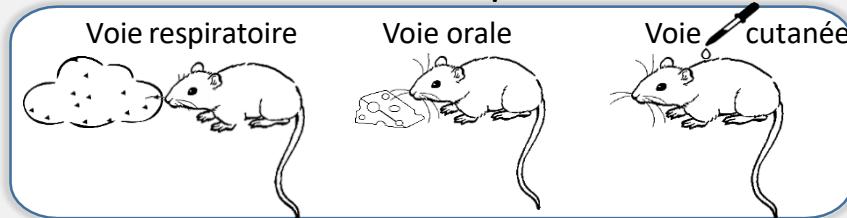


Principe de la toxicologie expérimentale chez l'animal



- Animaux sains (/ malade: pathologie pré-existante spontanée ou provoquée)
- Animaux jeunes, âgés
- Génétiquement modifiés, humanisés

Voies d'exposition



Durée d'exposition

aiguë



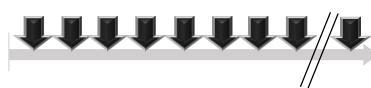
Quelques jours

subaiguë



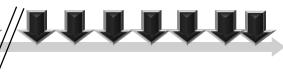
< 1 mois

subchronique



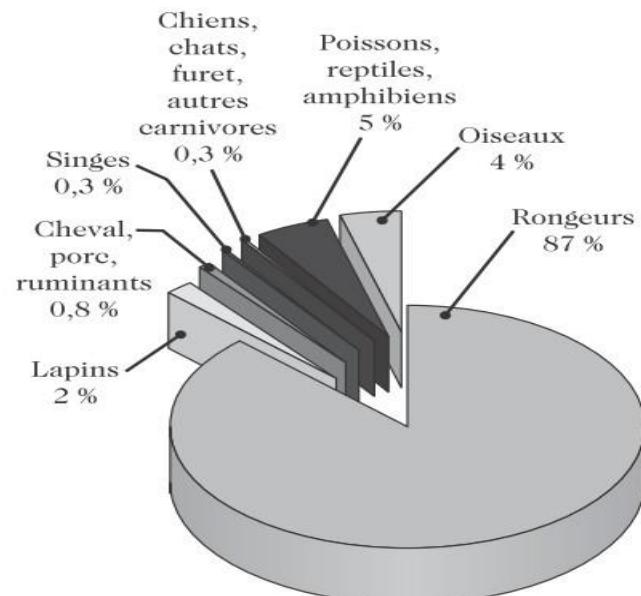
90 jours

chronique

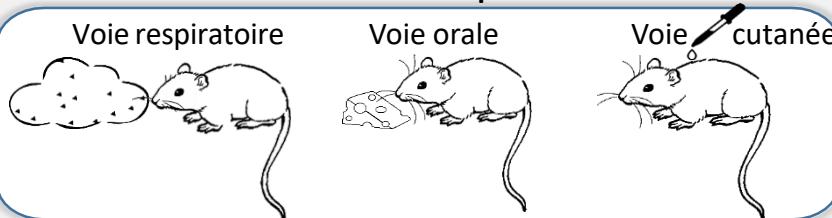


Plus de 3 mois

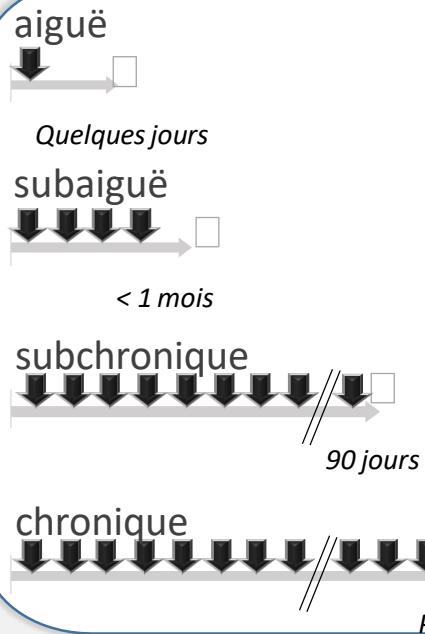
Modèles animaux



Voies d'exposition



Durée d'exposition



Modèles animaux



Paramètres de toxicité

Toxicité aiguë:

systémique (*détermination DL50*)

locale: - irritation, corrosion

- sensibilisation cutanée

Toxicité subaiguë/subchronique/chronique

identification organe(s) cible(s),

de l'effet critique,

détermination de NOAEL

Toxicité pour la reproduction et le développement prénatal

Mutagénicité

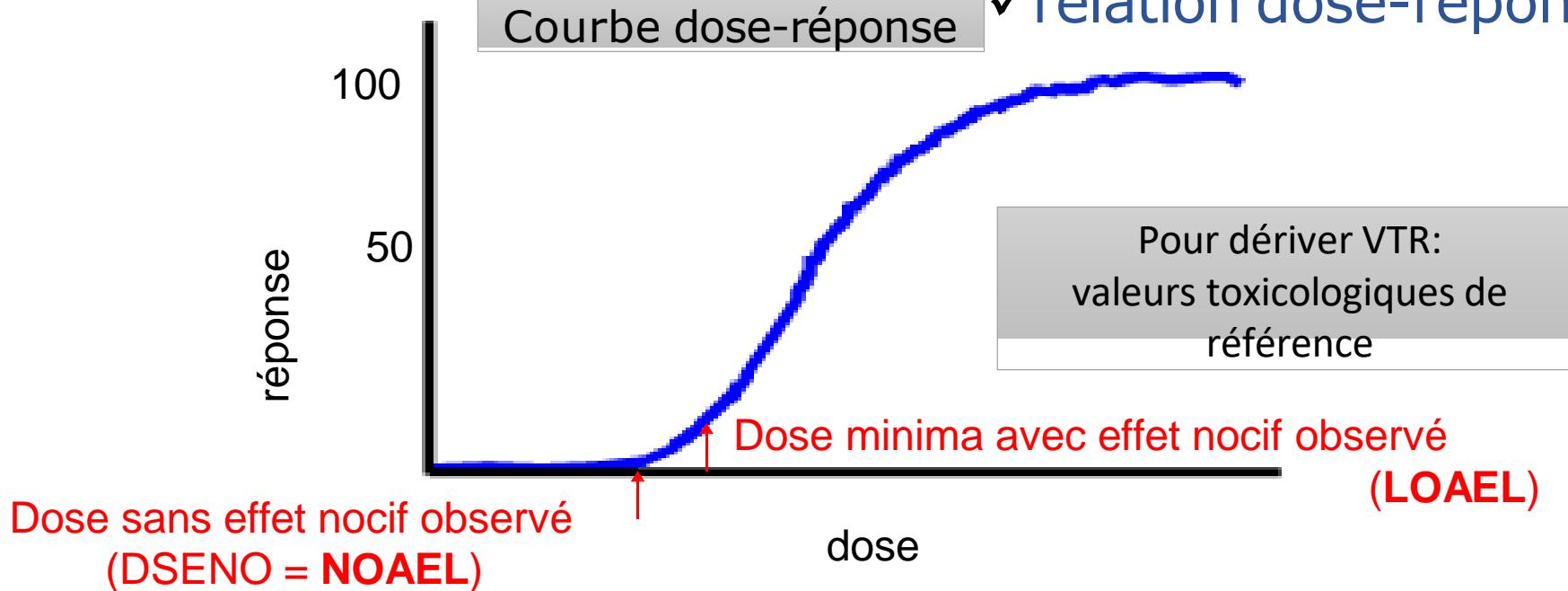
Cancérogénicité

Objectifs de la toxicologie expérimentale chez l'animal



- ✓ organes cibles
- ✓ réponse toxique
- ✓ relation dose-réponse

Courbe dose-réponse



Toxicité aiguë ou à dose unique



La toxicité aiguë vise à déterminer les **doses toxiques** chez l'animal et les **organes cibles** de cette toxicité.

- au moins 2 espèces de mammifères (généralement rat et souris), 2 voies d'administration (dont l'une sera la voie d'administration utilisée chez l'homme).
- Le produit est administré à dose croissante. Chaque animal reçoit une dose unique de produit.
- La durée de suivi après l'administration est généralement courte, 7-14 jours.

Cette étape permet de déterminer :

- la **DL50** : dose létale tuant la moitié des animaux ; n'est plus obligatoire depuis 1991.
- la dose maximale tolérée : dose qui provoque un effet toxique mais qui n'affecte pas la survie des animaux.
- la dose maximale sans effet toxique **NOAEL**.

Objectif: Détermination de la Dose Letale 50 (DL50) Dose capable de tuer 50% des animaux d'expérimentation.

Méthode : 3 doses uniques
10 animaux par dose

Observation d'au moins 14 jours.

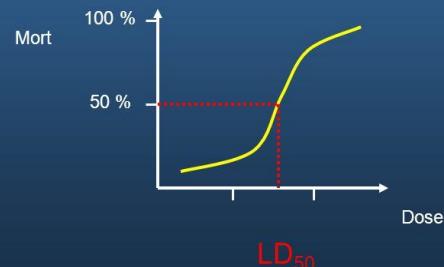
Alternatives à la DL50 :

Technique des approches successives
Une dose unique empirique (faible: 5mg/Kg, forte 500mg/Kg)

⇒ C'est une contrainte réglementaire
L'extrapolation à l'Homme reste aléatoire

Toxicité quantifié par la létalité
 DL_{50} CL_{50}

Ou relation dose-réponse pour l'effet mort



Toxicité chronique ou à doses réitérées

La toxicité chronique vise à obtenir des renseignements sur l'**aptitude du produit à s'accumuler dans les tissus** et à confirmer quels organes souffrent électivement de cette toxicité ➔

Extrapolation à l'homme:

l'absence d'effet toxique ne garantit pas la sécurité chez l'Homme

- au moins 2 espèces de mammifères dont une non-rongeur (généralement rat et chien/singe).
- La voie d'administration utilisée sera celle choisie pour l'homme
- administration quotidienne ou biquotidienne
- 3 doses de produit sont testées : une dose forte, une dose moyenne, une dose faible

ICH Guidelines = durée des études de toxicologie à dose répétée nécessaire

Durée de l'étude chez l'H	Rongeurs	Non rongeurs
1 dose, à 2 sem	2 sem	2 sem
Jusqu'à 1 mois	1 mois	1 mois
Jusqu'à 3 mois	3 mois*	3 mois
Jusqu'à 6 mois	6 mois	9 mois **
> 6 mois	6 mois	9 mois**

* 6 mois pour une phase 3 en Europe (EMA)

** règles de la FDA

Durée de TTT après AMM	Rongeurs	Non rongeurs
Jusqu'à 2 sem	1 mois	1 mois
Jusqu'à 1 mois	3 mois	3 mois
Jusqu'à 3 mois	6 mois	6 mois
> 3 mois	6 mois	9 mois

Surveillance clinique, biologique, autopsie

Poids, consommation alimentaire, comportement



Evaluation systématique et approfondie des grandes fonctions

- Cœur + ECG (torsades de pointes..)
- Poumon
- Système nerveux central
- Rein Etc.

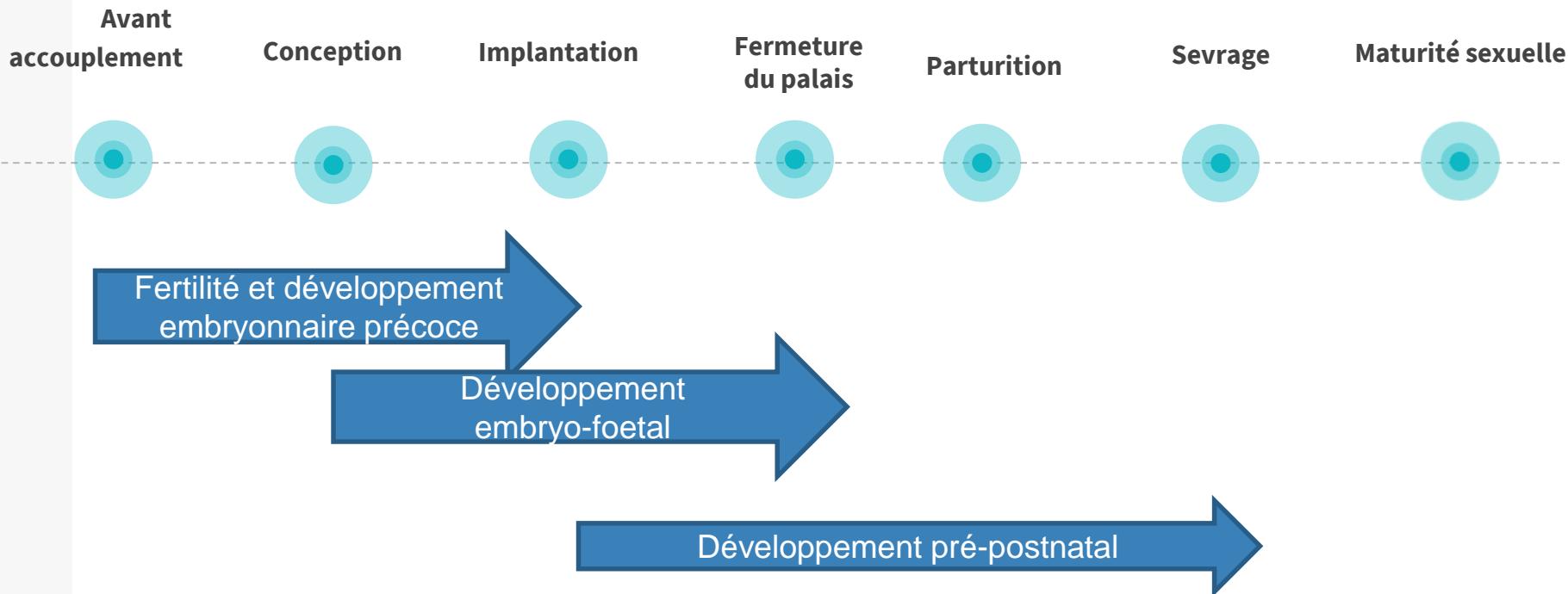
surveillance biochimique : sang, urines



Mortalité + lésions(anatomopathologie-histologie)

sacrifice et étude anatomo-pathologique détaillée (toxicité d'organe)

Reprotoxicité



Etude de reprotoxicité

3 doses testées

- **fertilité et développement embryonnaire précoce** jusqu'à implantation : rongeur (rat)

Administration du produit plusieurs semaines avant l'accouplement
groupe témoin d'animaux non traités

- **développement embryo-fœtal/étude de tératogenèse** : un rongeur et un non-rongeur (rat et lapin)

Administration du produit depuis l'accouplement jusqu'à la fin de l'organogenèse.
réalisée chez des femelles en gestation

- **développement pré et post-natal** : rongeur (rat)

Administration du produit de la fin de l'organogenèse jusqu'au sevrage des petits
Parturition, comportement maternel, allaitement et développement des petits.

Tests sur la fonction reproduction

Etude multi-générations

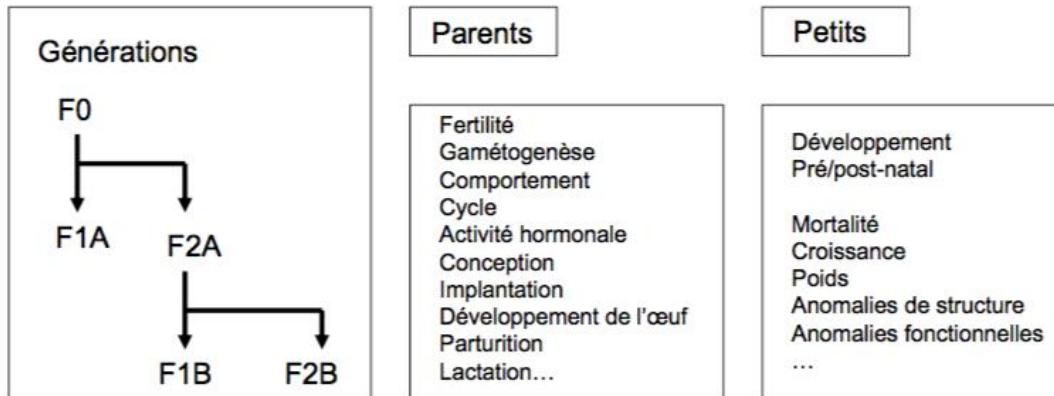


Exposition
(nourriture)

Parents : Mâles (120 j avant accouplement)

Femelles : 14 j avant accouplement \Rightarrow sevrage des petits

Petits : Conception \Rightarrow sevrage



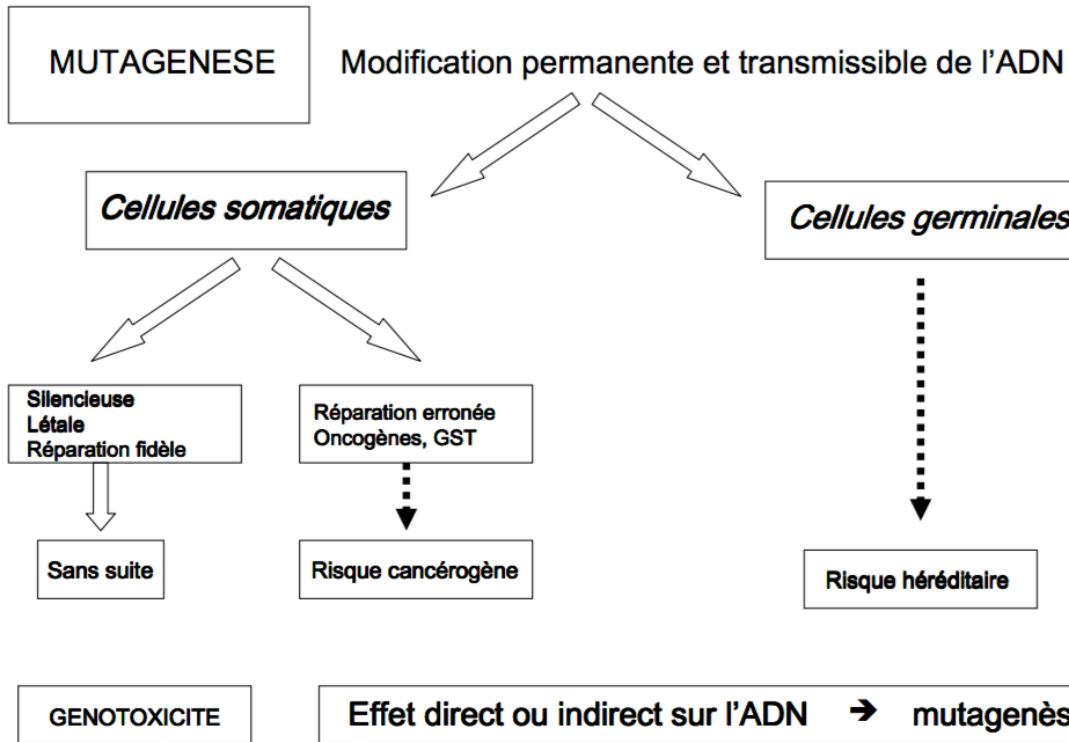
La génération de petits peut être suivie sur du long terme et sa descendance également.

Mutagénèse / Génotoxicité

Détecer d'éventuelles modifications du matériel génétique induites par le médicament (effet **mutagène ou clastogène**), que ce soit un risque de cancer pour la génération actuelle ou un risque génétique pour les générations futures.

Les tests seront adaptés à chaque spécificité de médicaments testés (antibiotiques, composés non absorbés...)

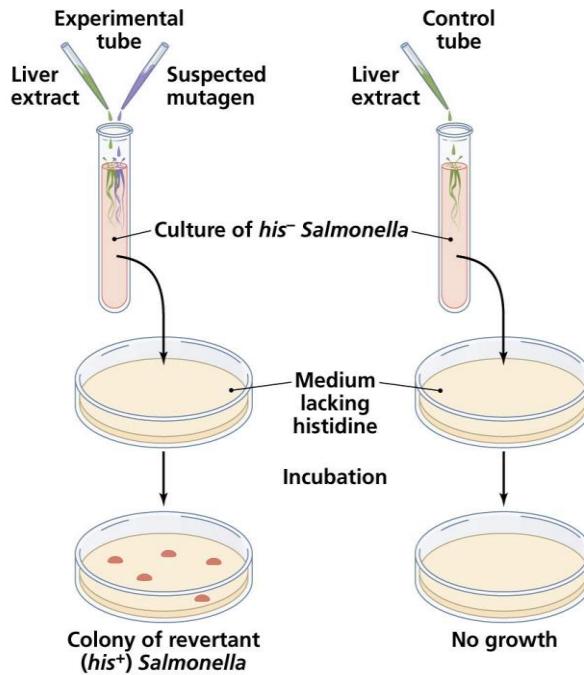
Mutagénèse et génotoxicité



Mutagénotoxicité

Tests réalisés

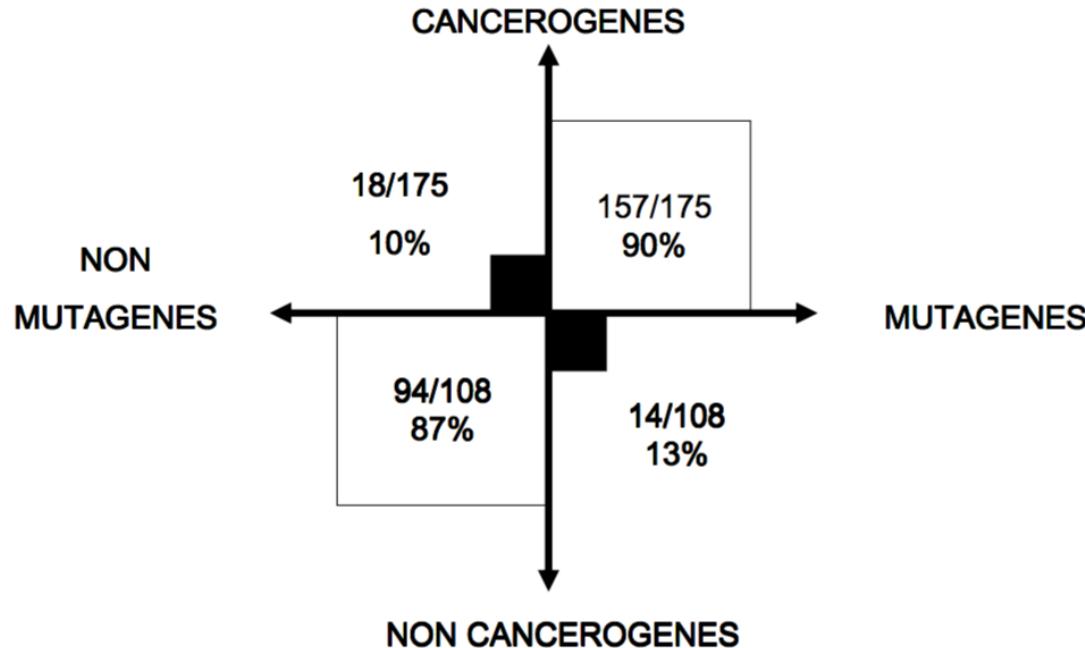
- Essai *in vitro* de mutation réverse sur bactéries (test d'Ames).
- Essai de mutation génique sur cellules de mammifère (cellules de lymphome de souris)
- 1 test d'aberration chromosomique ***in vitro*** chez le mammifère (rats ou souris).
- 1 test du micronoyau ***in vivo*** sur érythrocytes de mammifères de rongeur (rats ou souris).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- Cette étape permet de détecter un éventuel pouvoir cancérogène du produit,
 - Études menées en parallèle des études de première administration à l'Homme sauf en cas de signes d'appel (ex : tests de mutagénèse positifs).
 - Administration au long cours du produit (2 ans ou plus), chez 2 espèces (généralement rat et souris) avec 3 niveaux de doses.
 - La voie d'administration sera identique à celle utilisée en clinique.
 - Preuve de l'exposition au produit par des mesures répétées de concentration plasmatique.
- ➔ Augmentation incidence/diminution du délai d'apparition de tumeurs
Apparition de tumeurs rares absentes du groupe témoin

Relation mutagénèse/cancérogénèse



D'après McCANN & Ames, PNAS, 1976, 73, 950-654

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire : BPL ou GLP

- Organisation du laboratoire – Personnel
 - Assurance qualité
 - Installations, appareils, réactifs
 - Produits étudiés et produits témoins
 - Procédures opératoires standardisées écrites
 - Plan et conduite de l'étude
 - Rapports de résultats
 - Conservation des dossiers et des échantillons
- ⇒ Une étude expérimentale de toxicologie, c'est un protocole réfléchi, réalisé selon les BPL ... et des méthodes d'analyse statistique appropriées



Réglementation de l'expérimentation animale

Toutes les études doivent être effectuées conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (Arrêté du 20 janvier 1986)

A partir du 1/01/13, Décret d'application de la Directive europe 2010/63/UE

Autorisation de projet par les Comités d'éthique, qui deviennent réglementaires

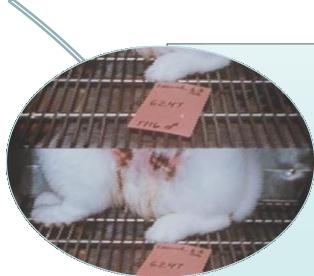
Agrément des établissements

Commission nationale de l'expérimentation animale

3 R : Remplacer / Réduire / Raffiner



Les 3 R (Russel and Burch, 1959)



Refine: raffiner

Espèces moins sensibles

Réduire douleur et détresse

techniques exploratoires non invasives



Reduce: réduire

Réduire le nombre d'animaux

Partage banque de données

-omics



Replace: remplacement

Études *in vitro* (tissus, cellules, molécules)

Études *in silico* (modélisation)

Etudes de chimie analytique

Le rôle de l'Union Européenne



Création de l'ECVAM en 1991:
European Center For Validation of
Alternative Methods

Joint Research Center
ISPRA (Italy)

*Directive 86/609/EEC** on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes,*

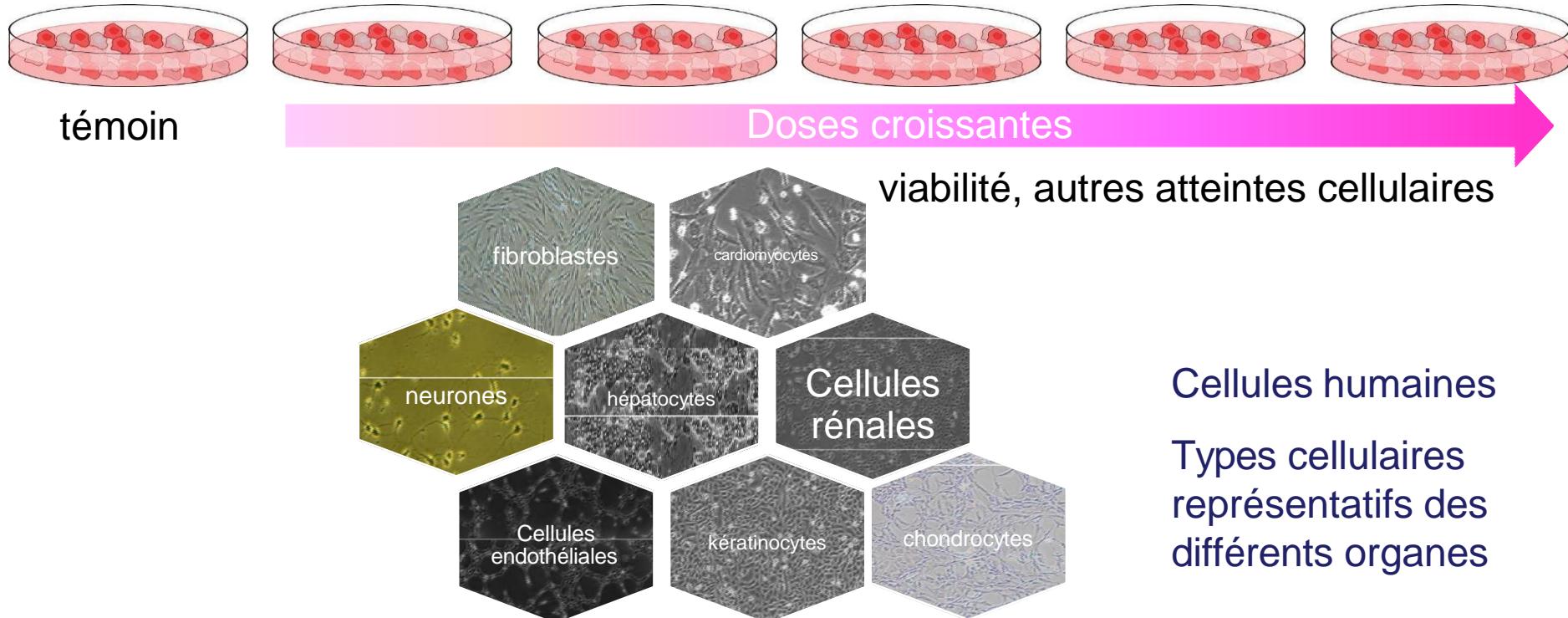
the Commission and the Member States should actively support **the development, validation and acceptance of methods which could reduce, refine or replace the use of laboratory animals**

PRINCIPE DES 3R DANS LE DEVELOPPEMENT DU MEDICAMENT

Phase de développement	Durée	Méthode et principe 3R appliquée
Découverte de nouveaux médicaments	3 ans	Recherche non animale Procédés informatiques; tests automatisés (high throughput screening); procédés d'imagerie.
Optimisation	2-3 ans	Etudes <i>in vitro</i> Cultures cellulaires; cultures tissulaires.
Développement préclinique	1-2 ans	Tests chez l'animal et <i>in vitro</i> Contrôle éthique; amélioration des conditions d'élevage; moins de tests contraints; amélioration des schémas d'étude; procédés d'imagerie; technologies des puces; microdosage; cellules souches; harmonisation internationale; remplacement d'espèces animales «supérieures» par des espèces «inférieures»; etc.
Tests cliniques	4-5 ans	Tests cliniques Phases I, II et III (sécurité d'emploi, efficacité et variabilité).

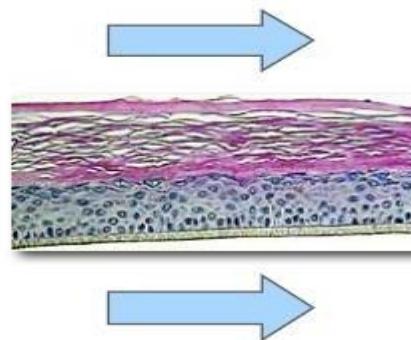
Principe de la toxicologie expérimentale *in vitro*

In vitro sur cultures cellulaires



Les cultures cellulaires en alternative à l'expérimentation animale

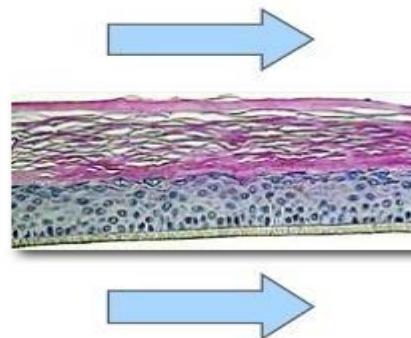
REEMPLACER



- Facilité de mise en œuvre (études à haut débit)
- Moindre coût (animaux)
- Etude des mécanismes d'action
- Utilisation de cellules humaines: plus de barrières inter-espèces

Les cultures cellulaires en alternatives à l'expérimentation animale

REEMPLACER



MAIS

- fonctionnalité des modèles cellulaires
- Culture non homéostasique
- Non adapté à certains produits à tester

Validation des méthodes *in vitro* au niveau réglementaire

Une méthode recevable par les autorités réglementaires doit être validée afin d'apporter la preuve

- de sa pertinence,
- de sa capacité à détecter les effets observés chez l'animal ou chez l'homme
- de sa reproductibilité

Etapes pour le remplacement d'un test réglementaire existant par une nouvelle méthode:

- l'élaboration de la méthode pour le test
- la prévalidation;
- la validation;
- la révision par les pairs ou l'évaluation indépendante
- l'acceptation au niveau réglementaire

Processus très long

Pré-requis spécifiques aux essais cliniques chez des enfants

Avant d'inclure des enfants dans un essai, il est recommandé d'**effectuer tous les tests de toxicologie animale** ainsi que dans la mesure du possible d'avoir exposé des adultes en pratique clinique courante.

Cas particulier des produits issus des biotechnologies

La nature particulière de ces produits ainsi que leur potentialité immunogène conduit à adapter les tests de toxicologie dans leur déroulement et l'élaboration de leur protocole.

LIMITES DES ESSAIS PRECLINIQUES

Nombre d'animaux testés est limité.

Durée d'observation est limitée.

Extrapolation à l'homme?

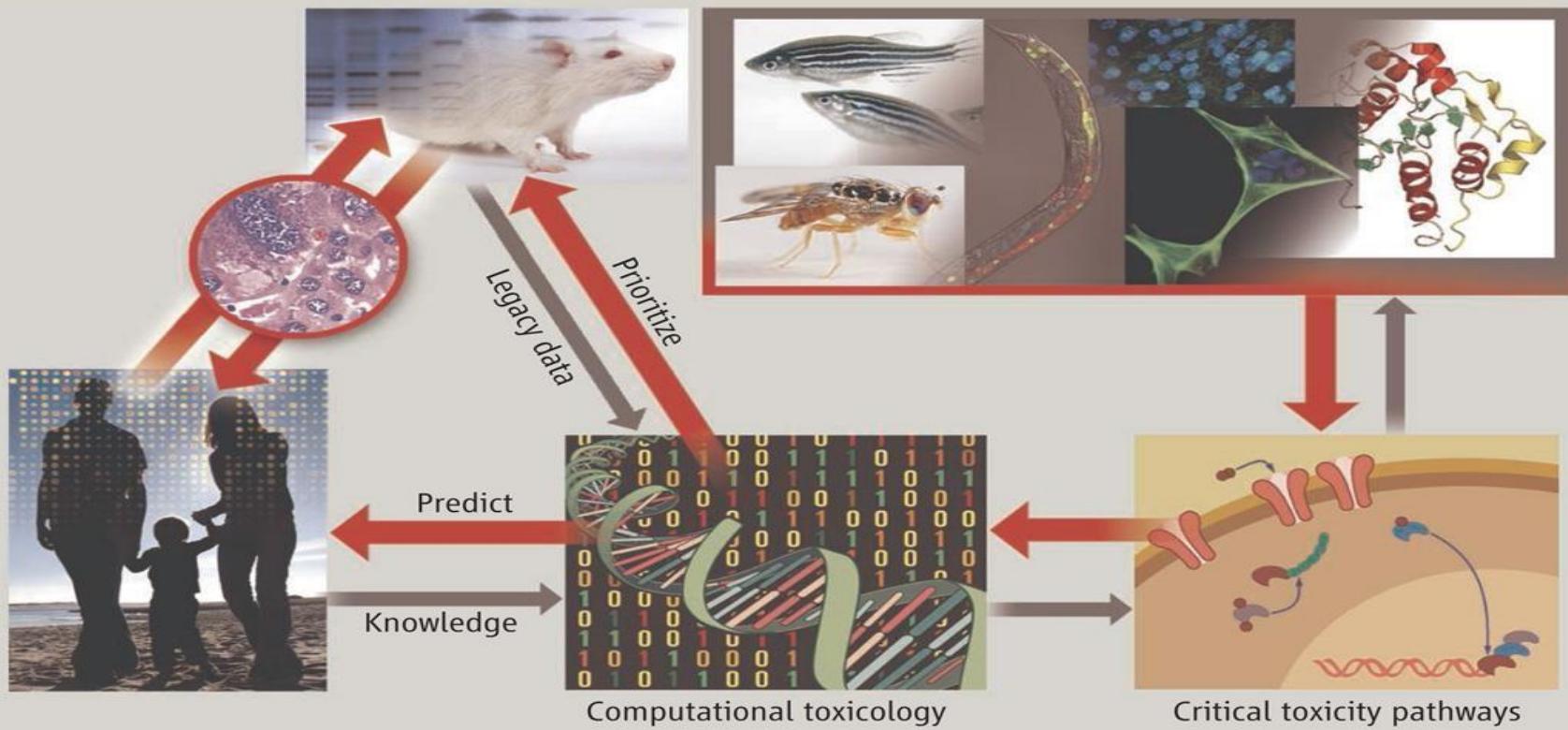
Certains effets ne se manifestent pas chez l'animal (troubles psychiques, allergie...).

Human experience
1–3 studies/year

Standard rodent toxicological tests
10–100/year

Alternative animal models
100–10,000/year

Biochemical- and cell-based in vitro assays
>10,000/day



Immediate human relevance

High throughput

QUELQUES REFERENCES

<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>

<http://www.ich.org/products/guidelines.html>

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000081.jsp