

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

## La Molécule

Par synthèse

A partir d'une chimiothèque

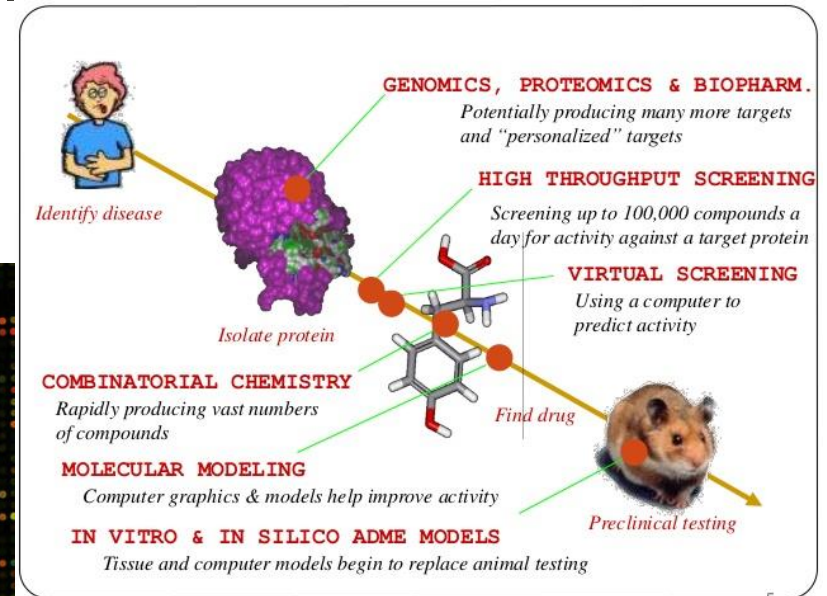
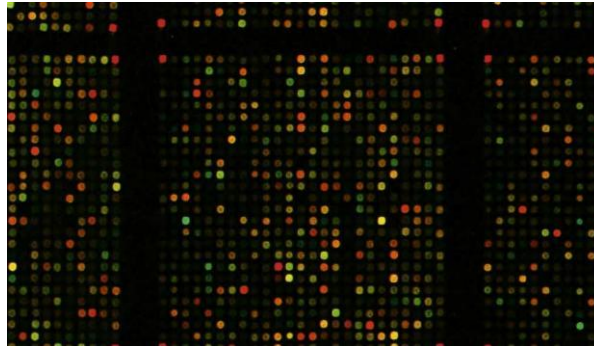
Par biotechnologie

## 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**.

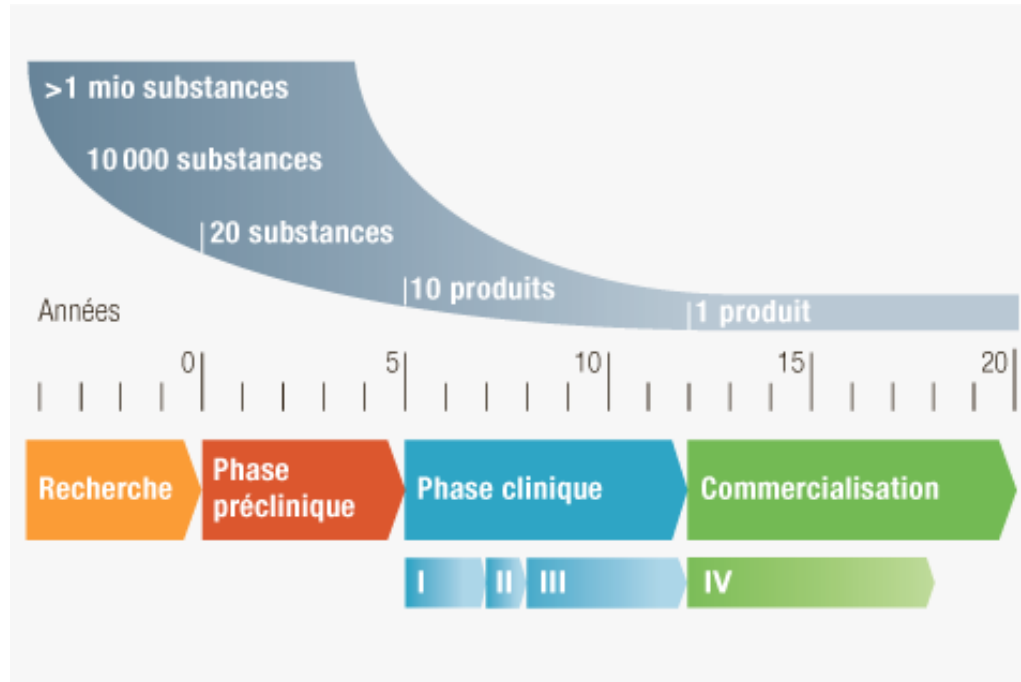
Avant d'être considéré « **Médicament** »

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

### **Deux grandes étapes d'études:**

- Études précliniques
- Études cliniques

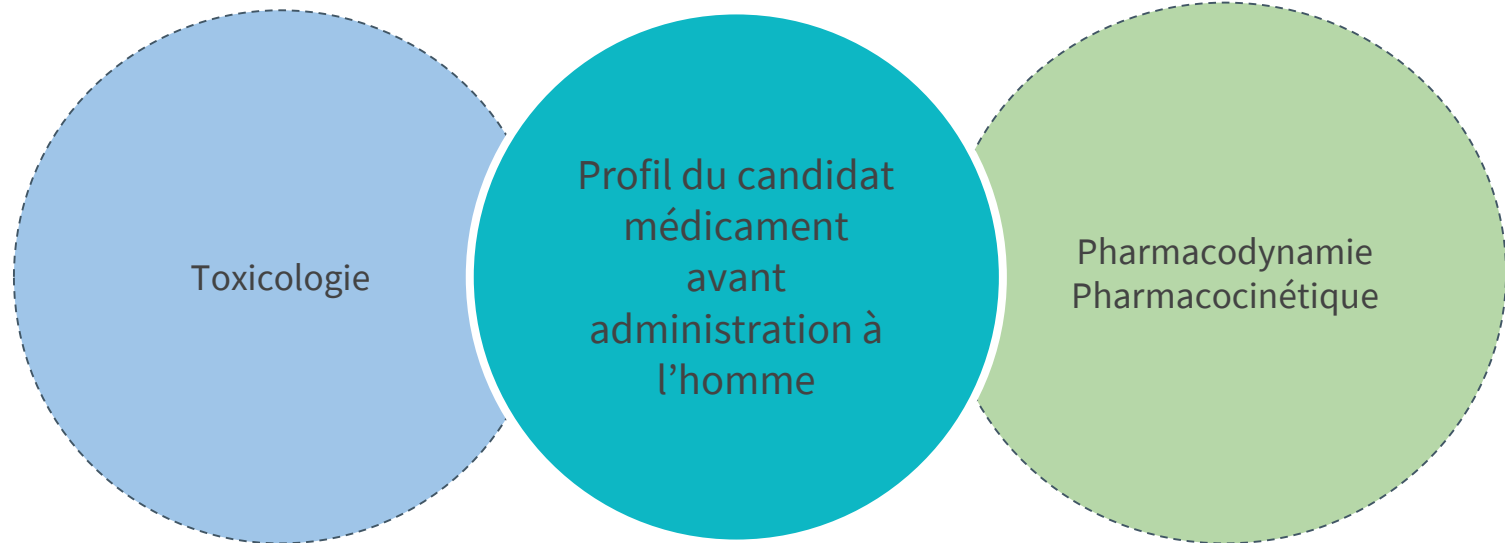
# GENESE D'UN MEDICAMENT



## Principales causes d'arrêt du développement

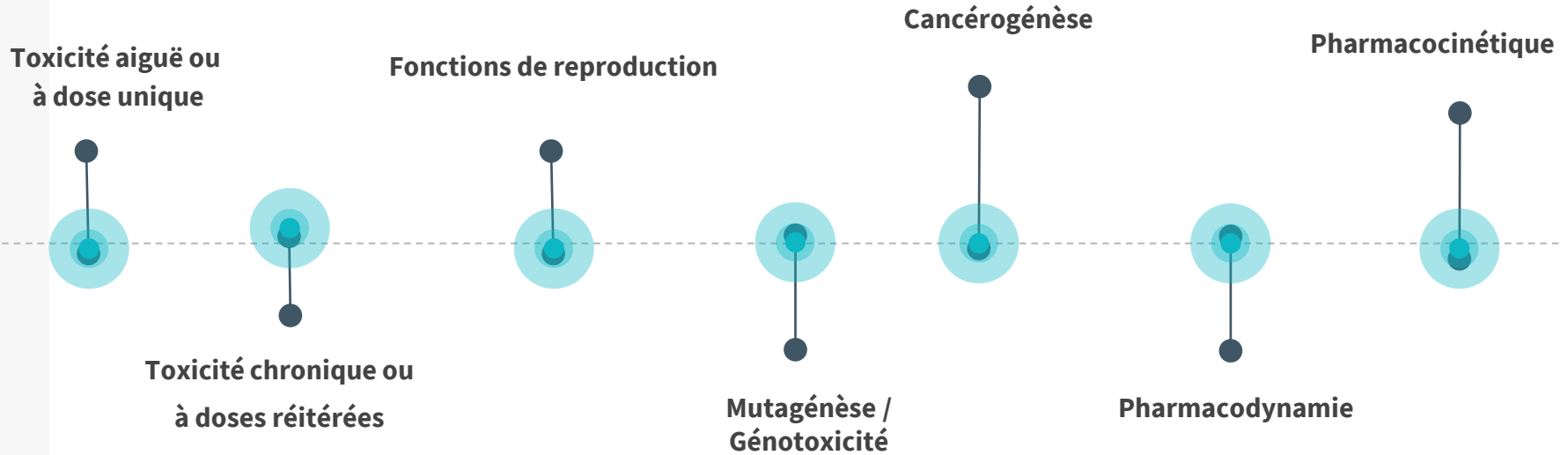
- **Problèmes pharmaceutiques (solubilité, impuretés...) (14%)**
- **Problèmes pharmacocinétiques (métabolisme, absorption...) (30%)**
- **Toxicité (préclinique) (26%)**
- Pas d'efficacité en clinique (11%)
- Mauvaise tolérance en clinique (5%)
- Décision stratégique (marketing, concurrence...) (14%)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

- **Pouvoir mutagène et cancérogène**

- **Autres toxicités**

- Tolérance locale
- Immunotoxicité

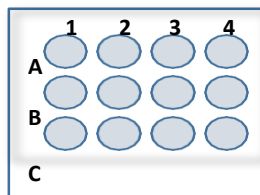
⇒ Réduire au maximum les risques liés aux premières expositions humaines

# Evaluation de la toxicité

## Approches expérimentales



*In vivo*



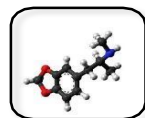
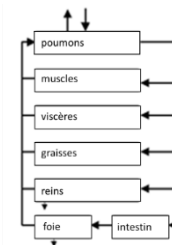
*In vitro*

## Modélisation

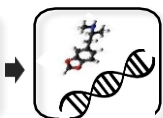
*In silico*



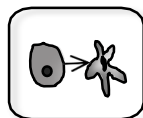
PBPK



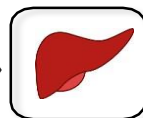
toxique



Interactions  
macromoléculaires



Réponses  
cellulaires



Réponses des  
organes



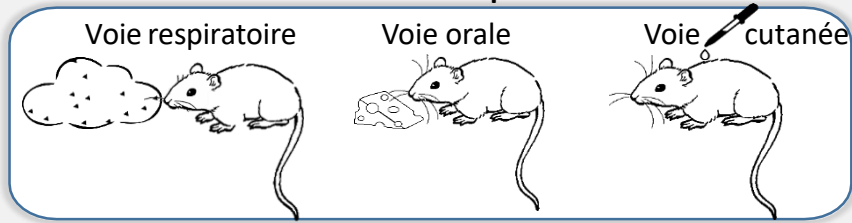
Réponses de  
l'organisme

# 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



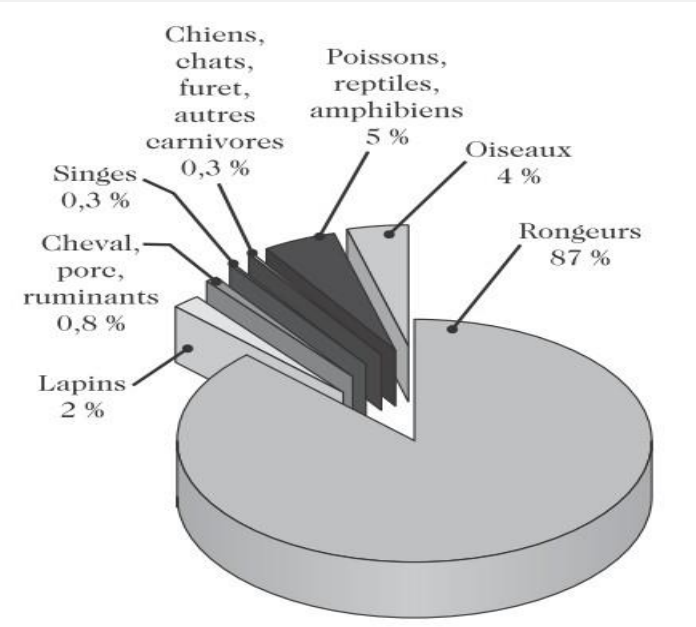
90 jours

chronique

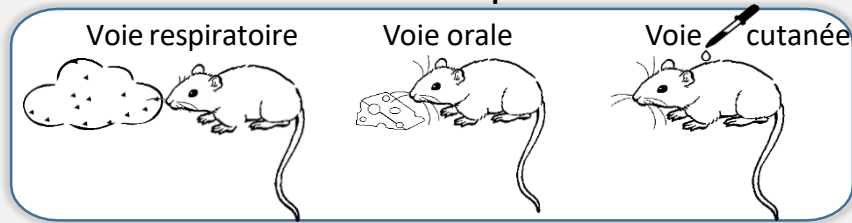


Plus de 3 mois

## Modèles animaux



## Voies d'exposition



## Durée d'exposition

aiguë



Quelques jours

subaiguë



< 1 mois

subchronique



90 jours

chronique



Plus de 3 mois

## 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

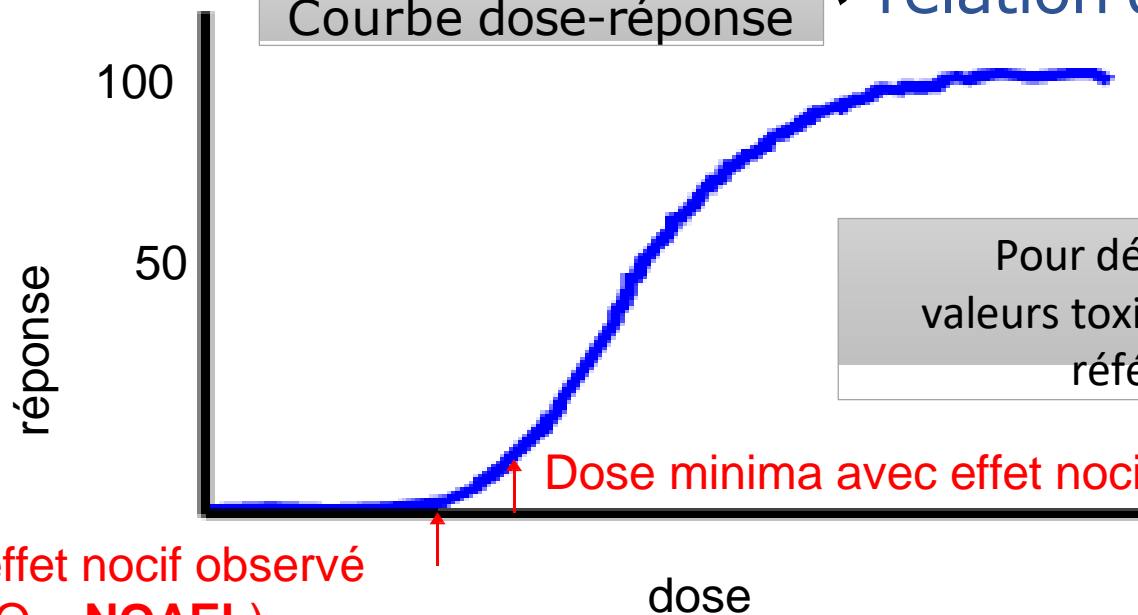
Cancérogénicité

# Objectifs de la toxicologie expérimentale chez l'animal



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

Courbe dose-réponse



Pour dériver VTR:  
valeurs toxicologiques de  
référence

Dose sans effet nocif observé  
(DSENO = **NOAEL**)



## 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'experimentation.

Méthode : 3 doses uniques  
10 animaux par dose

Observation d'au moins 14 jours.

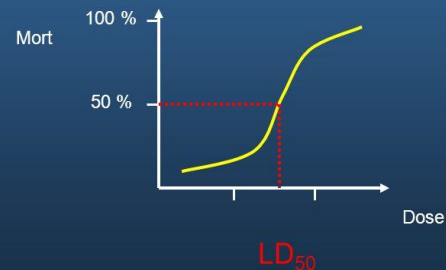
Alternatives à la DL50 :

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 quantifiée par la létalité DL<sub>50</sub> CL<sub>50</sub>

Ou relation dose-réponse pour l'effet mort



## Toxicité chronique ou à doses répétées

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'PH	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

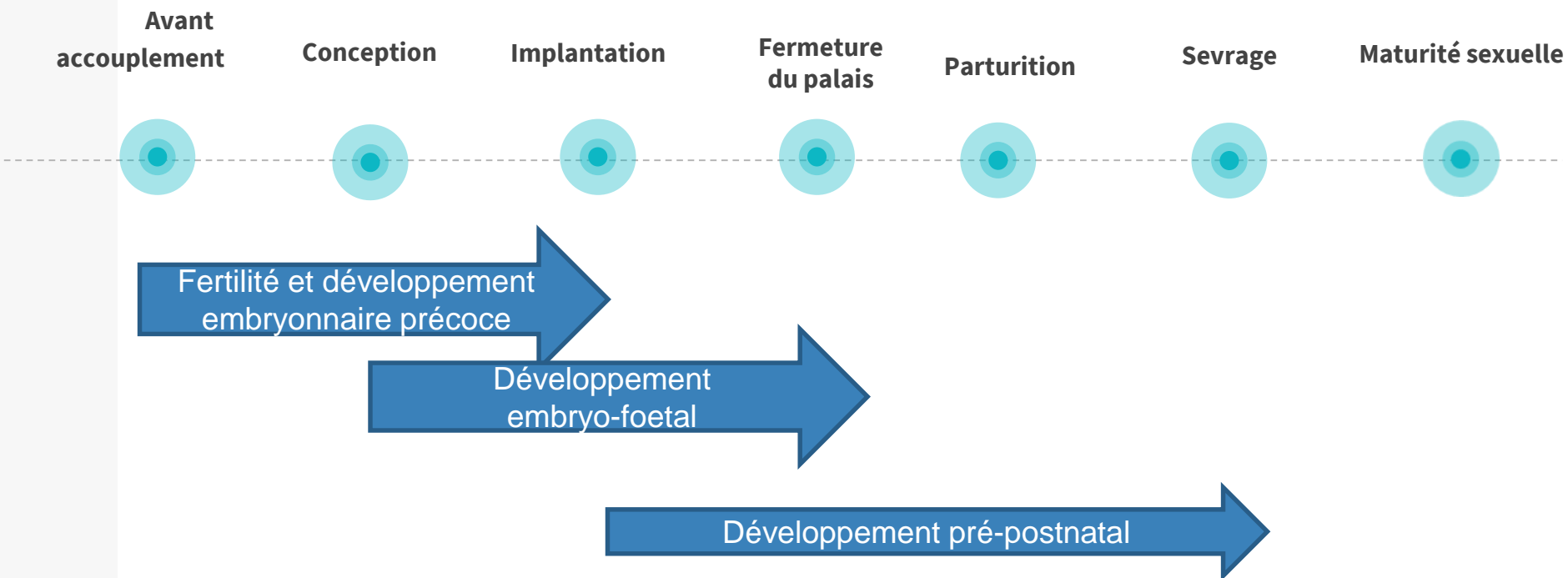
- Cœur + ECG (torsades de pointes..)
- Poumon
- Système nerveux central
- Rein Etc.

surveillance biochimique : sang, urines

Mortalité + lésions(anatomopathologie-histologie)

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





## 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-génération

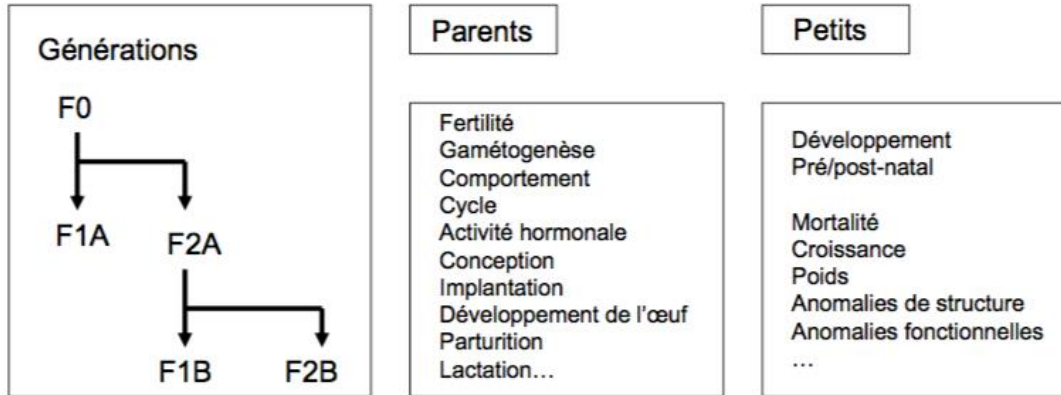


Exposition  
(nourriture)

Parents : Mâles (120 j avant accouplement)

Femelles : 14 j avant accouplement  $\Rightarrow$  sevrage des petits

Petits : Conception  $\Rightarrow$  sevrage



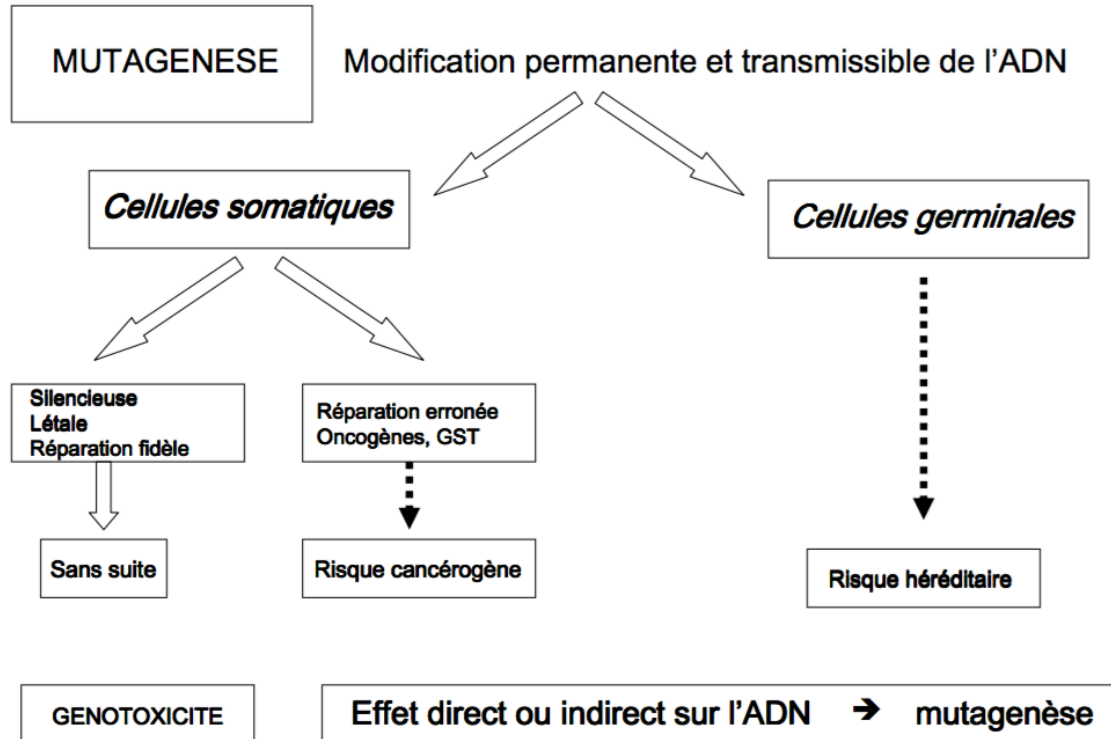
La génération de petits peut être suivie sur du long terme et sa descendance également.



Détecter 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...)

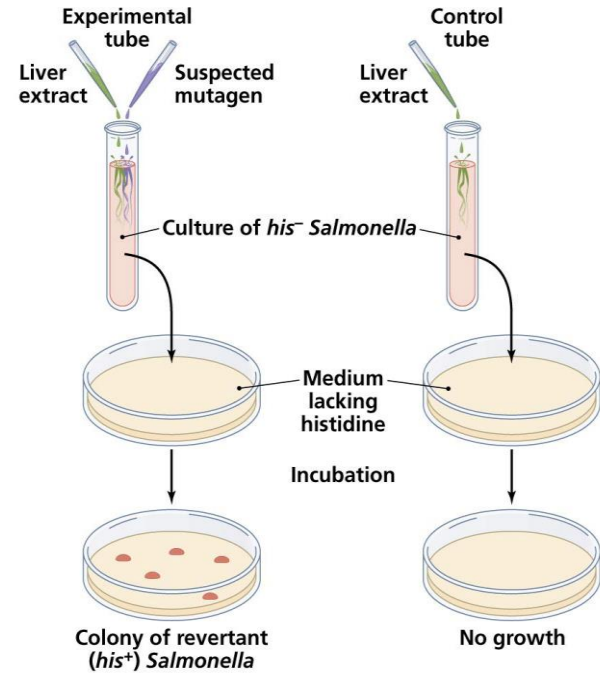
# Mutagenèse et génotoxicité



# Mutagénotoxicité

## Tests réalisés

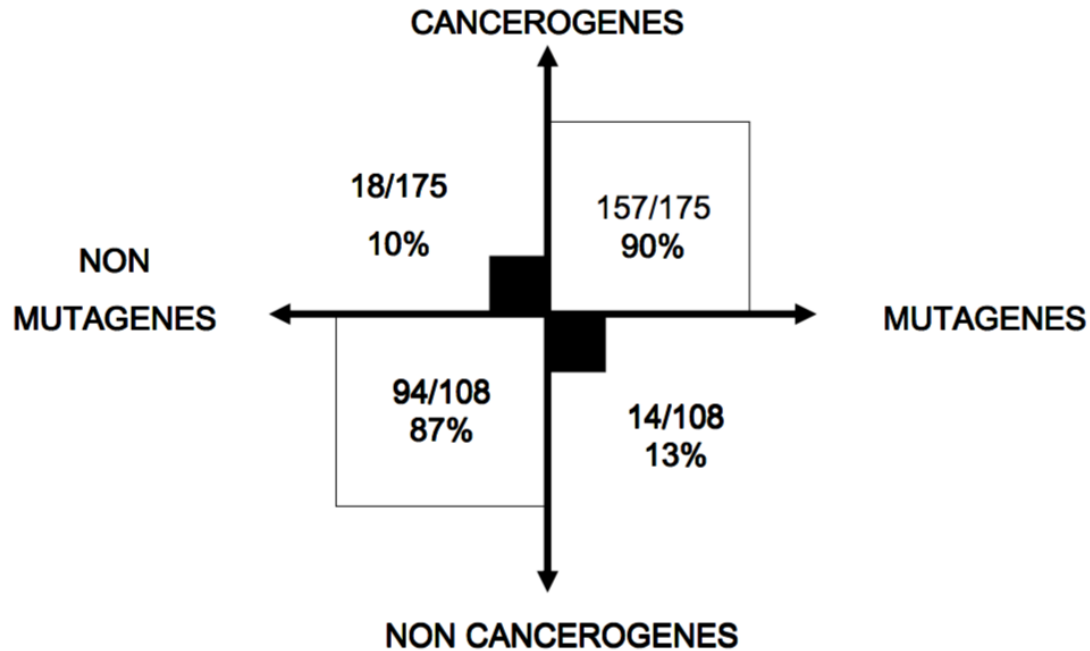
- Essai *in vitro* de mutation réverse sur bactéries (test d'Ames).
- Essai de mutation génique sur cellules de mammifère (cellules de lymphome de souris)
- 1 test d'aberration chromosomique ***in vitro*** chez le mammifère (rats ou souris).
- 1 test du micronoyau ***in vivo*** sur érythrocytes de mammifères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



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

- Cette étape permet de détecter un éventuel pouvoir cancérigène 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 Mc CANN & 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 europ 2010/63/UE

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

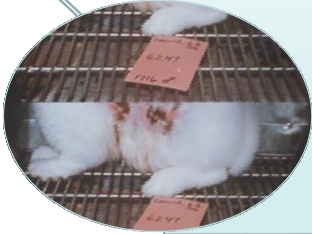
Agrément des établissements

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,

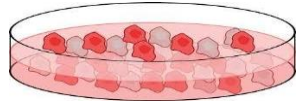
the Commission and the Member States should actively support **the  
development, validation and acceptance of methods which could  
reduce, refine or replace the use of laboratory animals**

## PRINCIPE DES 3R DANS LE DEVELOPPEMENT DU MEDICAMENT

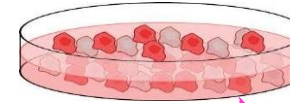
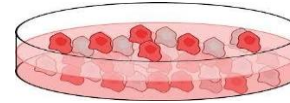
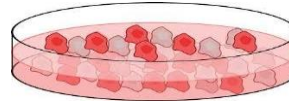
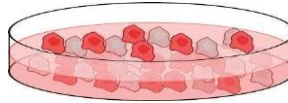
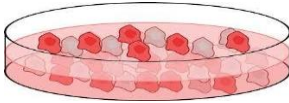
Phase de développement	Durée	Méthode et principe 3R appliqué
Découverte de nouveaux médicaments	3 ans	<b>Recherche non animale</b> Procédés informatiques; tests automatisés (high throughput screening); procédés d'imagerie.
Optimisation	2-3 ans	<b>Etudes in vitro</b> Cultures cellulaires; cultures tissulaires.
Développement préclinique	1-2 ans	<b>Tests chez l'animal et in vitro</b> Contrôle éthique; amélioration des conditions d'élevage; moins de tests contraignants; 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	<b>Tests cliniques</b> Phases I, II et III (sécurité d'emploi, efficacité et variabilité).

# Principe de la toxicologie expérimentale *in vitro*

## *In vitro* sur cultures cellulaires

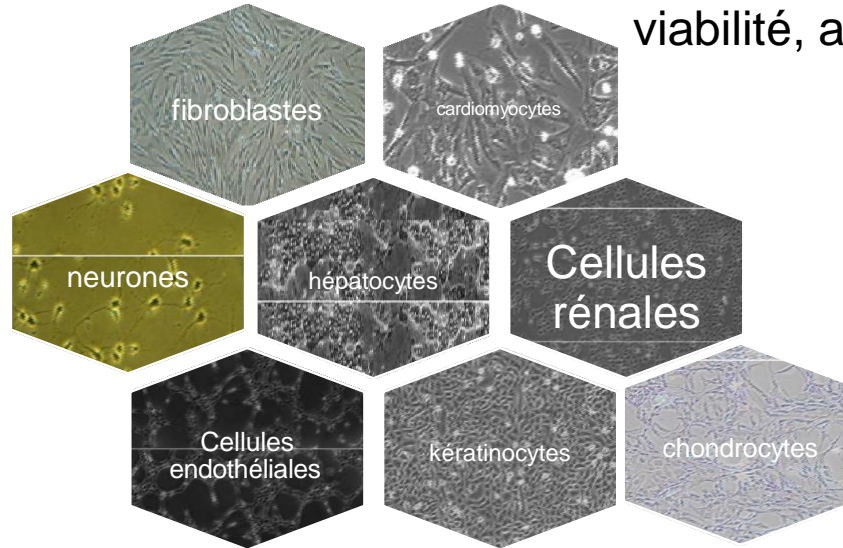


témoin



Doses croissantes

viabilité, autres atteintes cellulaires



Cellules humaines

Types cellulaires  
représentatifs des  
différents organes

# 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

Etapas 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**

## DES CAS PARTICULIERS

### 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...).

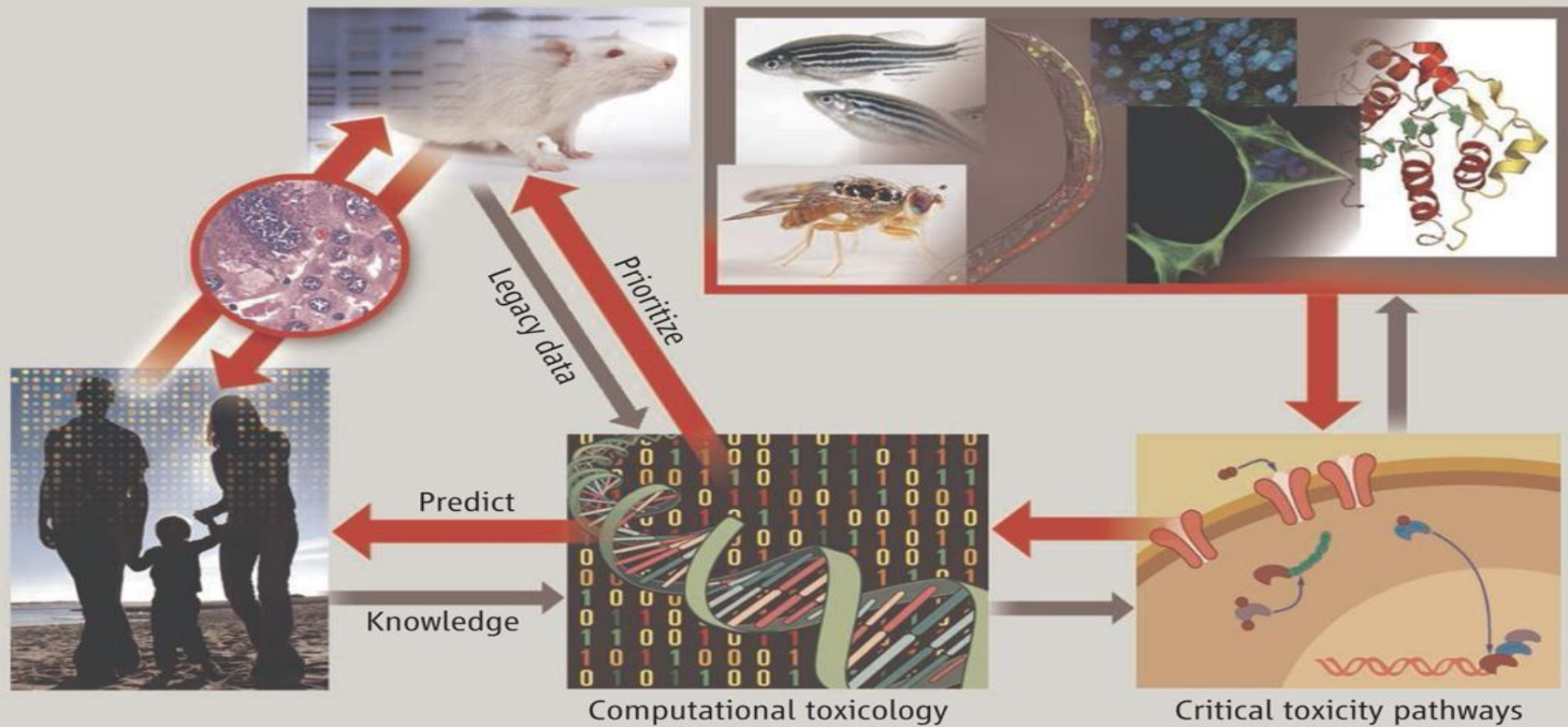


Human experience  
1–3 studies/year

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

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