

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département BPC



Pharmaco-Toxicologie Analytique

Chapitre 2 : Etude chez l'animale ou étude préclinique

Dr MOULAOUÏ KENZA

M1 PharmacoToxicologie
Année universitaire 2023 2024

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long, coûteux et toujours risqué pour un laboratoire. En effet, sur 5000 molécules initialement choisies comme étant de potentiels futurs médicaments, une seule en moyenne va aller jusqu'au bout du processus et obtenir une autorisation de mise sur le marché.



Après des phases de recherche fondamentale et de développement non-clinique et clinique d'un candidat médicament, le laboratoire va élaborer un dossier d'enregistrement à soumettre aux Agences de santé, pour obtenir une autorisation de mise sur le marché. C'est à ce moment là que les Agences de santé vont évaluer le rapport bénéfice/risque du médicament, en se basant sur les résultats d'efficacité et de sécurité des études cliniques.



Il faut d'abord trouver (ou fabriquer) les molécules qui auront l'effet voulu sur la cible thérapeutique. Ensuite, lorsqu'une nouvelle molécule est synthétisée, elle doit subir une panoplie de tests avant de pouvoir être reconnue comme médicament.

Ces tests ont pour but de confirmer l'effet recherché sur la cible voulue et de découvrir les caractéristiques chimiques, les réactivités biologiques, les vertus thérapeutiques ainsi que les effets néfastes possibles de cette molécule. Ils comprennent plusieurs analyses précliniques en laboratoire, puis sur des animaux.

Ensuite, on procède aux essais cliniques chez des humains en santé et, en tout dernier lieu, aux essais thérapeutiques chez des patients.

Les tests *in vitro* occupent une place sans cesse croissante dans le développement des médicaments, des phases précoces de sélection des nouvelles entités chimiques aux phases tardives de mise au point de nouvelles formes pharmaceutiques.

Cependant, l'utilisation des modèles *in vitro* et l'interprétation des résultats obtenus doivent prendre en compte en permanence les limites de ces modèles.



Développement non clinique

1. Etudes précliniques

Dans un premier temps, les produits sont soumis à une batterie de tests *in vitro* en laboratoire pour vérifier leur potentiel thérapeutique ainsi que certains aspects toxiques.

On évalue ainsi plusieurs paramètres (comme la rapidité d'action, la force de liaison et la spécificité aux récepteurs) en utilisant des cultures cellulaires, des cellules fraîchement isolées ou des organes.



Récemment, certaines compagnies ont commencé à utiliser des robots et des modèles protéiques (copies des récepteurs conçues par génie génétique) pour faire les premières évaluations des molécules synthétisées.

Les produits ayant le meilleur potentiel thérapeutique sont ensuite testés sur des animaux. Ces études précliniques visent bien sûr à évaluer l'efficacité, mais aussi la toxicité du produit étudié chez des modèles animaux sains.



In vitro: Est une expression qui provient du latin et qui signifie littéralement “dans le verre”. Cette expression est le reflet des expériences effectuées historiquement dans les récipients en verre tels que les tubes à essai.

Les tests *in vitro* sont réalisés conformément à des procédures spécifiques, avec des avantages, mais également des limites.



1. Déroulement

Réalisé à l'extérieur d'un organisme vivant, un test *in vitro* se déroule dans un environnement artificiel, généralement en laboratoire. Ainsi, les tests *in vitro* sont effectués dans un milieu artificiel qui peut être une reconstitution approximative des processus biologiques ou des conditions qui prévalent à l'intérieur d'un organisme.

Ces tests se déroulent dans un environnement contrôlé. Ils sont basés sur l'utilisation de molécules biologiques, de micro-organismes, de cellules, de tissus, isolés de leur environnement biologique et mis en culture dans des conditions contrôlées à l'intérieur d'un récipient de laboratoire (flacons, tube à essai, etc.).

Les cellules, les molécules biologiques sont examinées dans un milieu artificiel et contrôlé. Ces composants manipulés en laboratoire peuvent être mélangés à d'autres composants, exposés à des réactifs ou des produits chimiques en vue d'évaluer les réactions ou les effets de diverses interactions.

Les avantages

En plus de la mesure des activités des composants, les tests *in vitro* permettent d'évaluer séparément les effets biologiques des cellules et des micro-organismes. Leurs activités peuvent être rapidement déterminées et discriminées à l'intérieur d'un système. Ainsi, les avantages d'un test *in vitro* sont la rapidité et la possibilité de réaliser des expériences dans des conditions contrôlées.

Dans leur environnement biologique, les cellules interagissent avec plusieurs cellules et organes. Isolées de leur milieu habituel, les cellules sont mieux explorées et analysées avec une meilleure compréhension des propriétés et des modes d'actions qui les caractérisent. Ainsi, les tests *in vitro* permettent d'isoler un phénomène et d'expliquer un mécanisme d'action. Ils permettent de faire avancer les connaissances avant d'entreprendre les explorations au sein de l'organisme.

Limites des tests *in vitro*

Les tests *in vitro* ne peuvent que mettre en évidence, les effets ou les réactions partielles d'un micro-organisme ou d'une cellule ou d'un phénomène.

Les résultats des tests *in vitro* sont partiels avec un nombre limité de composants ou de paramètres.

Ils ont peu de rapport avec la clinique et ne prennent pas en compte la complexité du fonctionnement de l'organisme, des diverses interactions entre les cellules et les organes. Aussi, ces résultats ne sont pas extrapolables à l'organisme humain qui n'est pas une simple juxtaposition de cellules ou de composants isolés.

Le développement préclinique fait en particulier appel à **l'expérimentation animale**, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'Homme. En effet il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'Homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître.

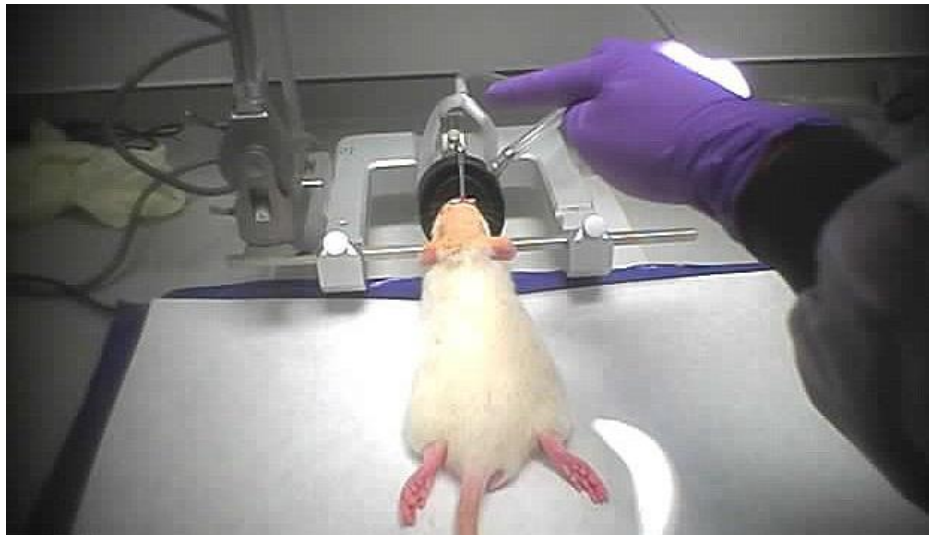


Les modèles *in vivo* concernent de nombreuses espèces animales qui vont des petits animaux de laboratoire, comme les rongeurs, aux « gros » animaux de rente tels que le porc ou la vache.

Ces modèles animaux sont utilisés, par exemple, pour étudier les mécanismes physiopathologiques d'une maladie, identifier de nouveaux biomarqueurs ou cibles biologiques, ou encore évaluer l'efficacité d'une thérapie innovante



L'expérimentation animale est donc utilisée de manière rationnelle et, dans tous les cas, selon des bonnes pratiques qui garantissent un traitement éthique de l'animal de laboratoire. En 1959, la **règle des « 3R »** a été élaborée. Elle constitue le fondement de la **démarche éthique** appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Elle repose sur trois principes qui sont : **Réduire** le nombre d'animaux en expérimentation ; **Raffiner** la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption) et **Remplacer** les modèles animaux



Pour diminuer le recours à l'expérimentation animale, des méthodes alternatives sont étudiées. Par exemple, la mise au point de tests sur des cultures de cellules humaines permet d'apprécier la toxicité d'un candidat médicament pour l'Homme de manière plus prédictive.



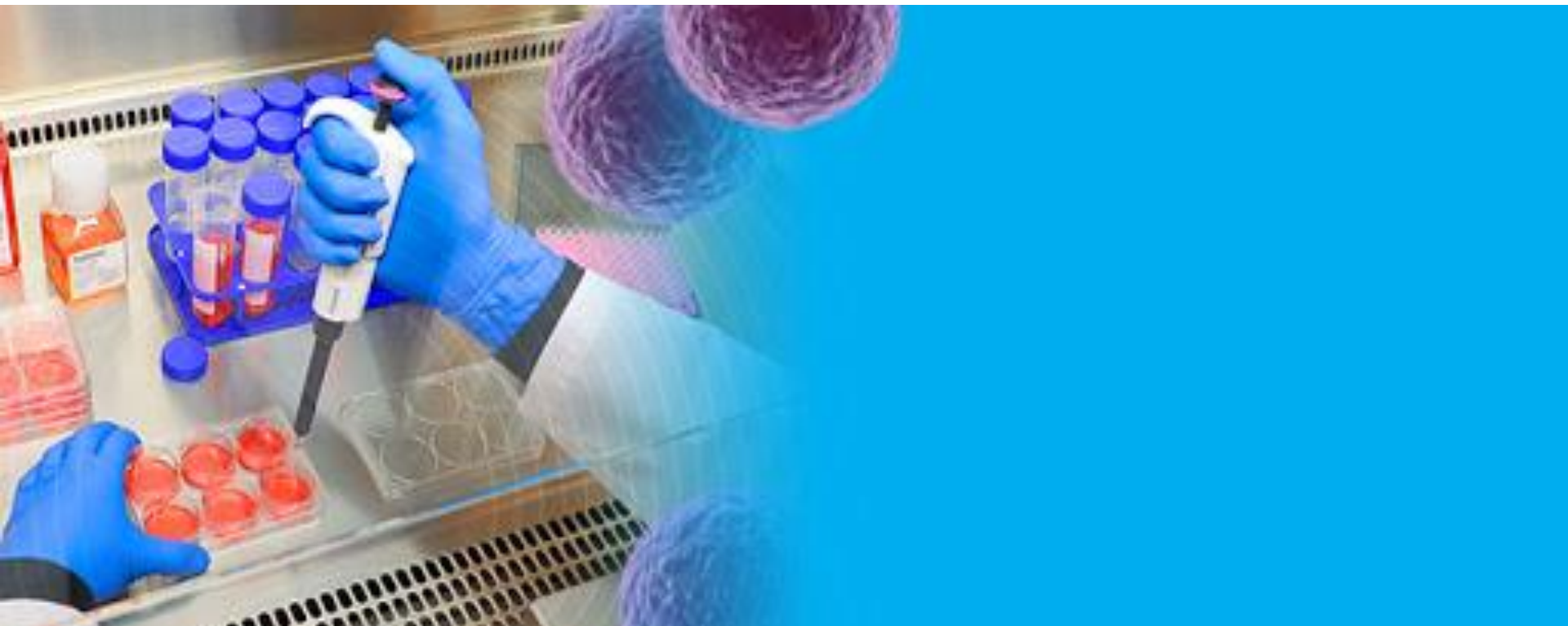
Culture Cellulaire

La culture cellulaire est devenue un outil essentiel depuis l'établissement de lignées cellulaires *in vitro* d'origine animale et humaine.

La mise au point de modèles *in vitro* pour imiter l'environnement *in vivo* a nécessité la caractérisation de lignées cellulaires en tant que modèles de monoculture ou de co-culture avant de pouvoir être utilisées avec succès.

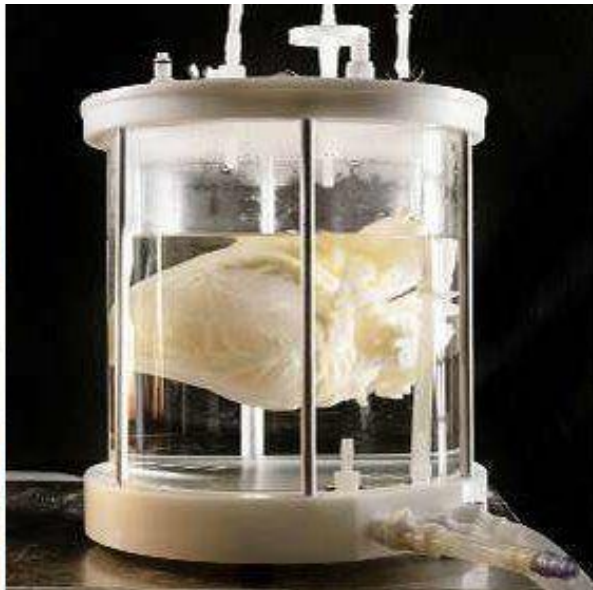
Modèles *in vitro* de culture cellulaire

Les progrès technologiques réalisés au cours des 40 dernières années dans le domaine de la culture cellulaire ont permis d'accroître la recherche sur les troubles de différents pathologies et les mécanismes physiologiques dans le but de minimiser les expériences *in vivo* préalables aux essais cliniques.

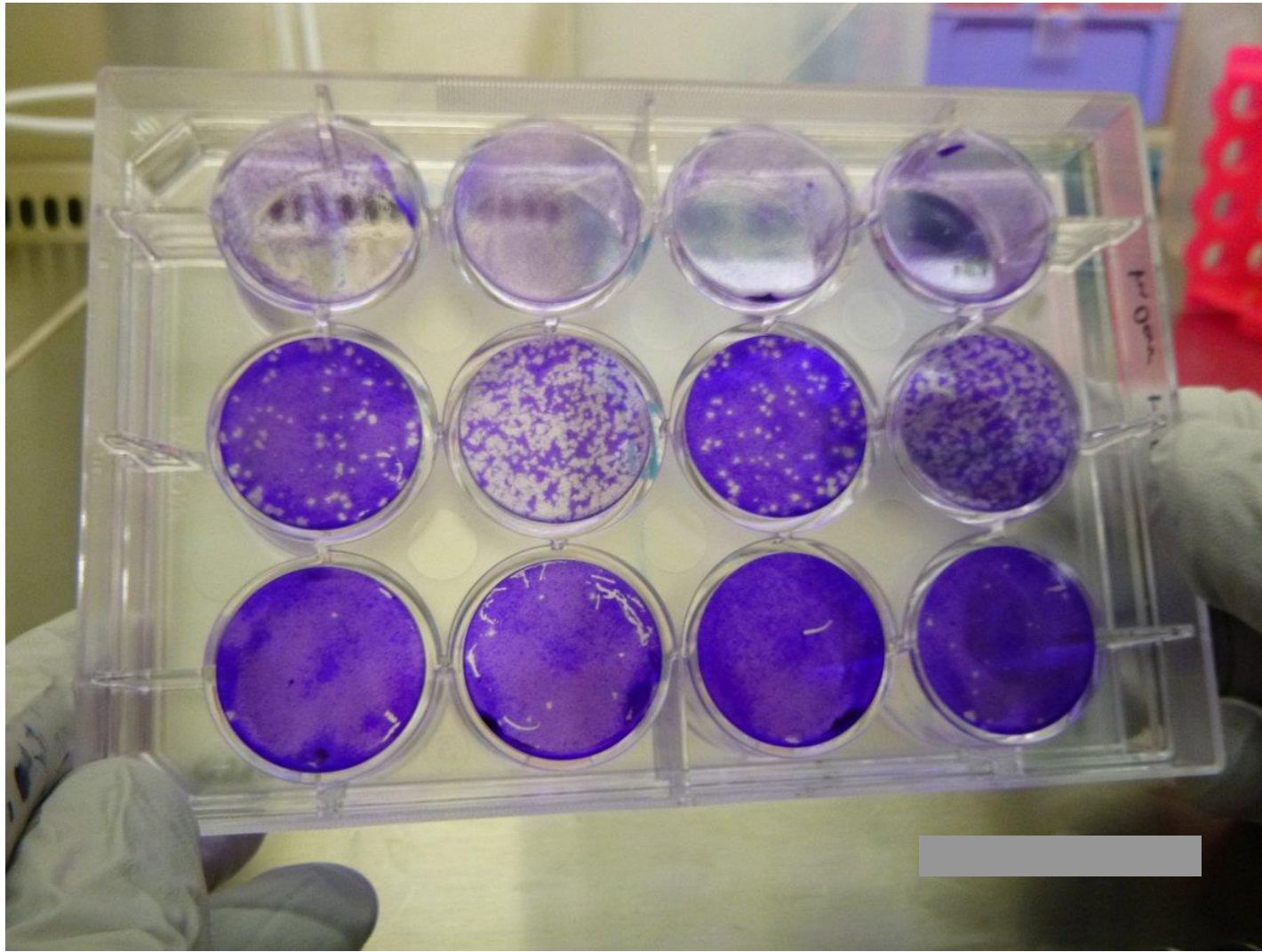


Il existe essentiellement 3 types de cultures cellulaires: la culture d'organe, les cellules en culture primaire et les lignées cellulaires.

- **La culture d'organes** consiste à faire survivre un certains temps un fragment d'organe ou de tissu en conservant son intégrité, son architecture et sa fonction.



- **Les cellules en culture primaire** sont au contraire dissociées les unes des autres avant d'être placées en culture pour la première fois sur un support. Elles ont une capacité prolifératrice suffisante jusqu'à former un tapis.



- **Les lignées cellulaires** sont des populations capables d'effectuer un nombre limité ou illimité de division en culture, par repiquage successifs.



Ces nouvelles stratégies de recherche préclinique, alternatives, permettent de raccourcir la durée des études, de limiter les dépenses consacrées à la recherche de nouveaux médicaments et de réduire le nombre d'animaux utilisés.



Cependant, si ces méthodes sont plus économiques en temps, en argent et en vies animales, elles ne peuvent pas encore se substituer aux expérimentations menées sur l'animal entier.

Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études est effectué afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Elles répondent à des normes internationales de qualité scientifique et sont étroitement évaluées par les autorités de santé au moment de délivrer l'AMM.

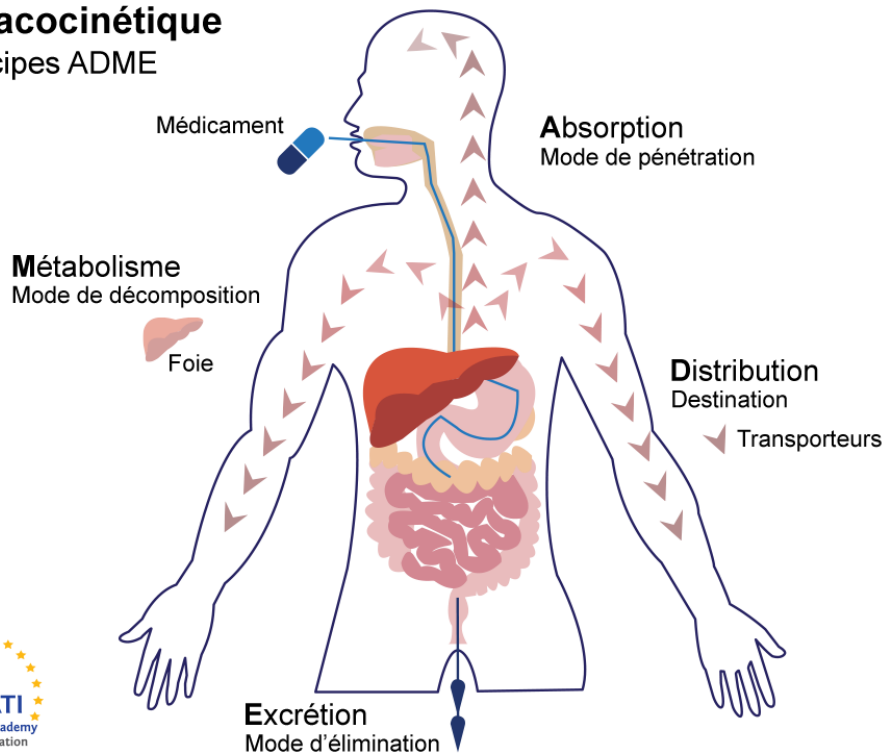
La phase pharmacocinétique

But de la pharmacocinétique:

Les études de pharmacocinétique permettent de décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant. Il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination.

Pharmacocinétique

Les principes ADME



Système A-D-M-E

- A = Absorption
- D = Distribution
- M = Métabolisme
- E = Elimination-Excrétion

Le comportement global, l'activité motrice, les réflexes et la température corporelle doivent être évalués chez l'animal.

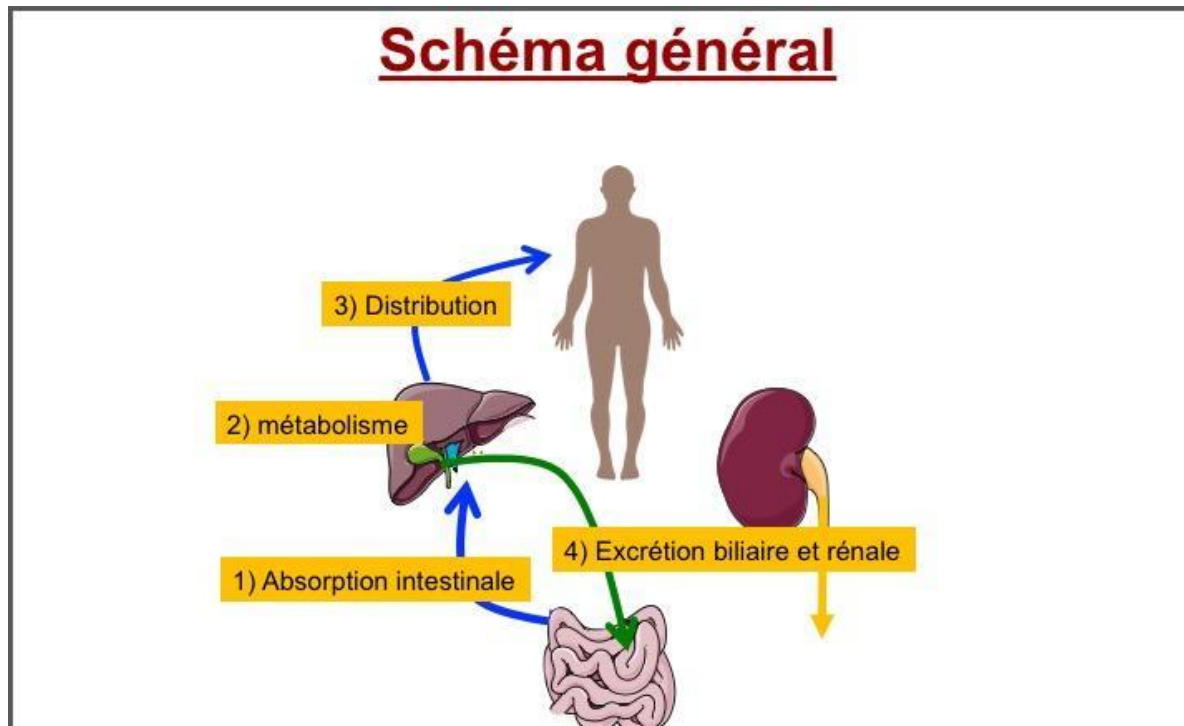
Le potentiel de pharmacodépendance et d'abus doit être caractérisé pour tout médicament innovant et/ou actif sur le système nerveux central.

Pour chacune de ces études, l'administration unique du composé est préconisée par la voie prévue chez l'Homme.

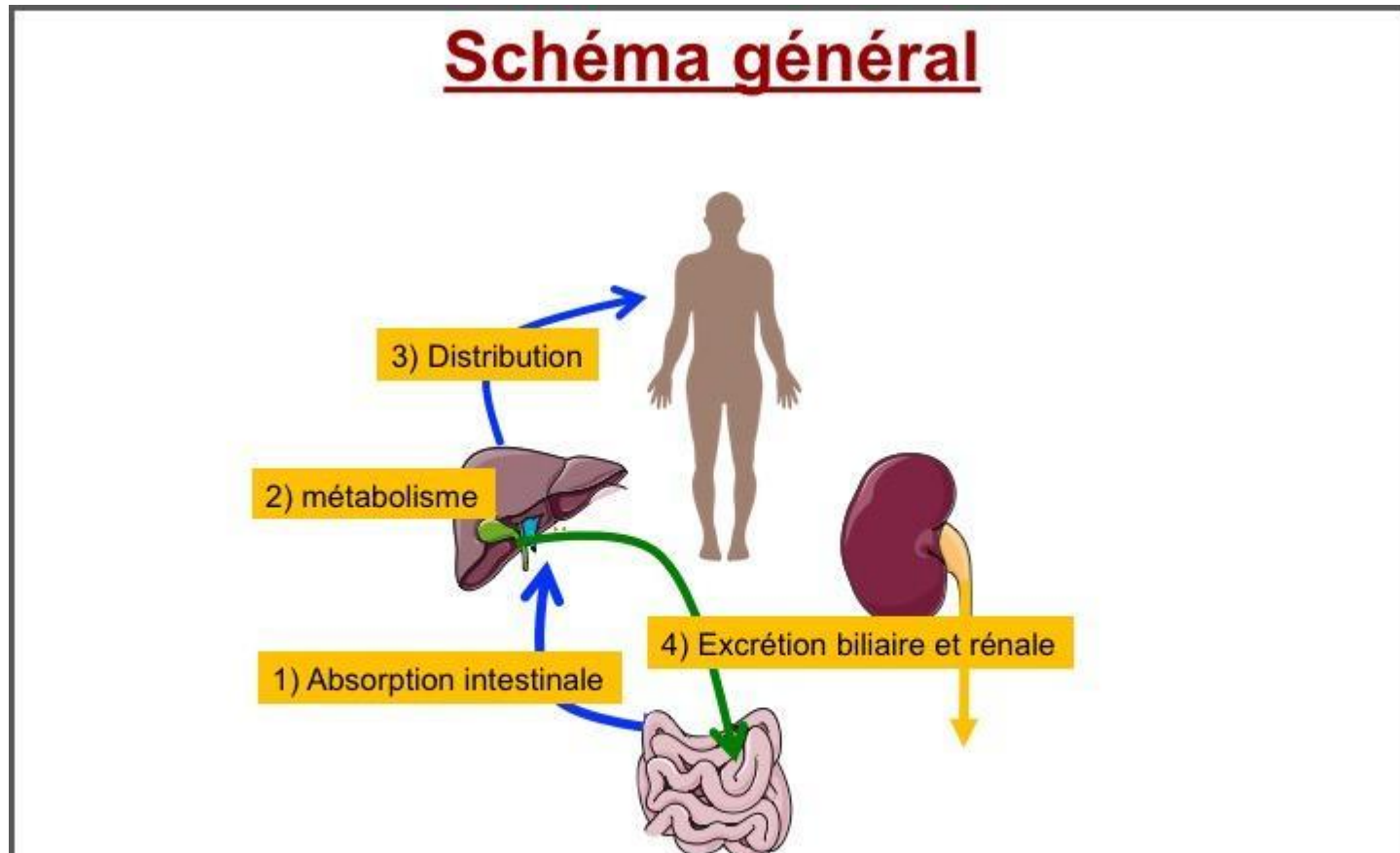


L'étape d'absorption est directement liée au mode d'administration choisi pour que la molécule atteigne sa cible via la circulation générale.

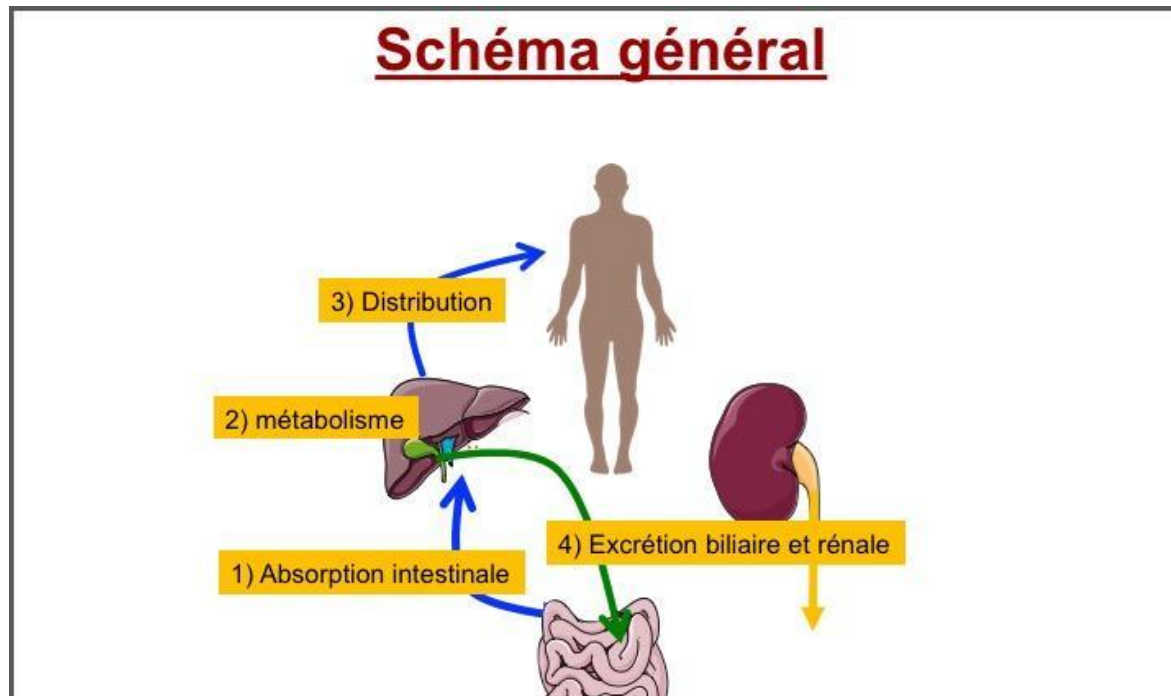
Il est aisé de comprendre que l'étape d'absorption peut être directe et complète en cas d'administration intraveineuse, ou plus longue voir incomplète (notion de biodisponibilité) notamment en cas d'administration orale où le médicament doit d'abord franchir la lumière intestinale, le système porte, puis le foie avant d'atteindre la circulation générale.



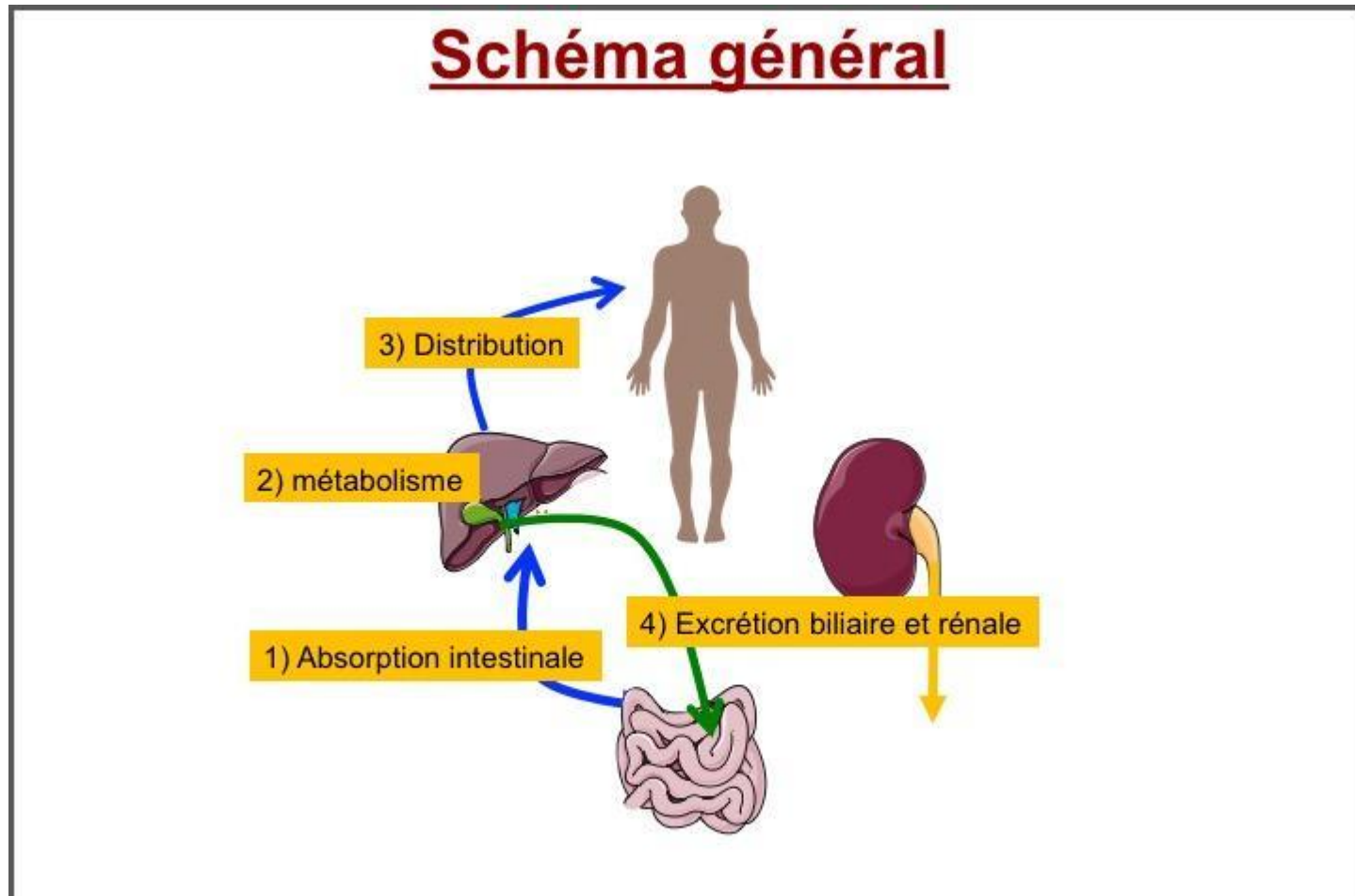
Le médicament va devoir traverser des membranes cellulaires pour cette étape d'absorption et pour l'étape suivante de distribution dans l'organisme, qui lui permettra d'atteindre sa cible moléculaire. Certaines molécules franchissent ces membranes facilement, d'autres molécules peuvent nécessiter des transporteurs spécifiques pour passer.



Une fois distribué dans l'organisme, en fonction de leurs caractéristiques chimiques les médicaments peuvent ou non subir certaines transformations, le plus souvent hépatiques. Le foie correspond à une énorme usine sur le parcours du médicament. Ces biotransformations (ou métabolisme hépatique) sont réalisées par différents systèmes enzymatiques pouvant soit permettre la transformation de molécules inactives en molécules actives, soit plus généralement la transformation du médicament en métabolites actifs mais plus faciles à éliminer.



Enfin le médicament est éliminé de l'organisme soit sous forme inchangée soit après biotransformation. Cette étape d'excrétion, irréversible, se fait dans les urines le plus souvent (voie rénale) ou dans les voie biliaire. Certaines molécules peuvent être réabsorbées, ce qui définit un cycle entéro-hépatique.



Les paramètres pharmacocinétique étudiés sont la biodisponibilité de la molécule à étudier, son volume de distribution, le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques, la clairance et enfin le temps de demi-vie dans l'organisme.

Les études de pharmacocinétique s'intéressent donc à l'évolution de la concentration du médicament dans la circulation générale. Le sang irriguant tous les organes, dont les organes cibles du médicament, cette concentration constitue souvent une information pertinente pour estimer la concentration de médicament autour des sites d'action et donc prédire les effets du médicament.

- **Le Médicament atteint-il sa cible en concentration suffisante ?**
- **Pour un temps assez long ?**
- **Atteint-il des cibles non souhaitables ?**

Quelle est la signification du C max ?

- Un médicament avec un C max (trop) faible peut être inefficace si son activité est concentration-dépendante
- Un médicament avec un C max (trop) élevé peut devenir toxique si sa toxicité est liée au C max
- Il faut donc ajuster la dose pour atteindre le C max adéquat!

Quelle est la signification de la clairance ?

- Un médicament à clairance rapide ne reste pas longtemps dans l'organisme... et peut donc nécessiter des administrations répétées...
- Mais un médicament peut montrer une clairance lente à cause de sa liaison aux protéines, qui empêche son élimination
- Si la clairance diminue pendant le traitement (ou est anormale dès le début du traitement), le patient sera “surdosé” !

Biodisponibilité

- Quantifie l'absorption depuis le site d'administration jusqu'au sang
- Est mesurée en comparant la voie orale (ou autre) à la voie intraveineuse

Une biodisponibilité faible réduit à la fois le C max et l'absorption et conduit donc à une diminution de l'efficacité

2. La pharmacodynamique

La pharmacodynamique est l'étude de l'évolution temporelle de l'effet biologique du médicament, de la relation entre l'effet et l'exposition au médicament (dose-effet) et du mécanisme d'action du médicament.

La liaison d'un médicament au niveau d'un récepteur cellulaire provoque l'initiation d'une cascade de messagers moléculaires qui va se traduire par un effet pharmacodynamique.

Les études de Pharmacocinétique/Pharmacodynamique visent à relier ces deux disciplines. Par une description quantitative des processus d'absorption, de distribution, de métabolisation, d'élimination et d'action du médicament.

Les études pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique permettent d'aider à la détermination d'un schéma posologique pour choisir au mieux la voie d'administration, la dose et les fréquences d'administration.

La pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamique

Dépend de :

Variabilité individuelle

Facteurs physiologiques

Facteurs pathologiques

Association de médicaments

De nombreux facteurs influent sur les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination. En effet, l'âge, le poids ou l'ethnie de l'individu vont influencer. De même, l'environnement (tabagisme, alimentation), la physiopathologie (insuffisance rénale ou hépatique) et l'administration concomitante d'autres substances doivent aussi être pris en compte.

Pharmacologie de sécurité

La pharmacologie de sécurité est un élément réglementaire incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Avant les études cliniques, les effets du candidat médicament sur les fonctions vitales (systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux central) doivent d'abord être étudiés et caractérisés chez l'animal en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.



Évaluation de l'efficacité

Quel que soit le médicament que l'on désire sélectionner, un analgésique, un antibiotique..., il est nécessaire de déterminer d'une manière approfondie sa propriété principale et de préciser par une étude systématique tout autre effet concomitant éventuel sur les autres appareils cardio-vasculaire, respiratoire, rénal, etc.

Ceci explique qu'une exploration systématique de tous les effets possibles d'un médicament soit nécessaire.

Ces études, qu'il n'est pas possible de citer ici, se font sur l'animal entier, sur des organes isolés, des cellules isolées, des fractions cellulaires isolées, enzymes, récepteurs. Elles précisent les propriétés et les mécanismes d'action des médicaments.