

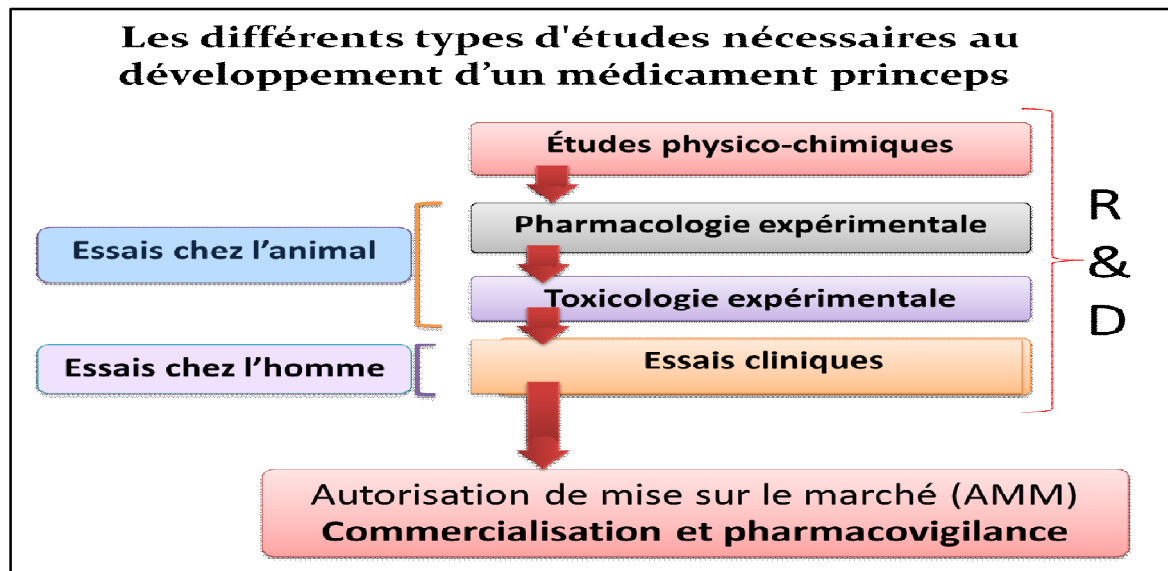
Développement préclinique des médicaments

Introduction :

Le développement d'un médicament principe de la molécule jusqu'à la commercialisation nécessite dix à quinze ans de recherche pour explorer tous les champs d'investigation.

Ces travaux, tests précliniques, essais cliniques et de développement industriel, sont strictement encadrés par la loi.

En industrie pharmaceutique, les termes "recherche et développement" couvrent un processus long et fastidieux. Les étapes de recherche et développement couvrent les études réalisées entre la découverte d'une molécule et sa commercialisation. Sur dix mille molécules testées en recherche et développement, seulement une arrivera à passer tous les stades jusqu'à la commercialisation.

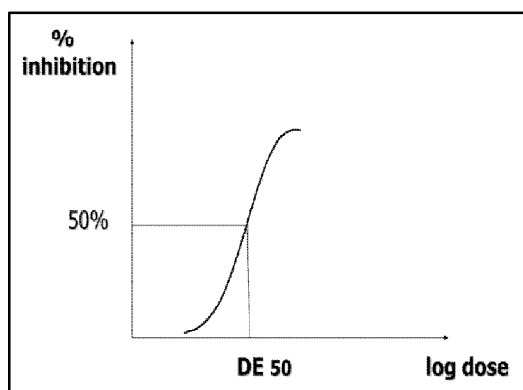


Pharmacologie expérimentale

1. **Définition :** La pharmacologie expérimentale permet de sélectionner des molécules présentant une activité pharmacodynamique.
2. **Le screening pharmacologique :**
 - a. **Définition du screening :** C'est un criblage des molécules par des tests codifiés pour découvrir d'éventuelles propriétés pharmacologiques.
 - b. **Classification**
 - b1. **Screening général :** C'est une présélection systématique des molécules sur plusieurs tests physiologiques appartenant à plusieurs systèmes (cardiovasculaire, digestif ; nerveux etc...). Permet de découvrir les têtes de série et la constitution de chimiothèques.
 - b2. **Screening orienté :** Limité à quelques activités appartenant à quelques systèmes seulement. Ex : recherche de l'activité anti-inflammatoire d'un dérivé non stéroïdien.
3. **Le modèle en pharmacologie expérimentale**
 - 3.1. **Définition :**

Système qui vise à reproduire un effet pharmacologique en dehors du sujet original. Exemples :

 - Psychotropes : rat, souris.
 - Anticancéreux : souris.
 - Anesthésiques locaux: lapin
 - 3.2. **Types de modèles :**
 - Modèle utilisant l'animal entier
 - Modèle utilisant un organe isolé
 - Modèle utilisant une culture cellulaire
4. **La réponse biologique en pharmacologie expérimentale :**
 - **Réponse qualitative :** effet du tout ou rien. Exemple : Souris présentant ou non des convulsions après injection d'une substance pro convulsivante.
 - **Réponse quantitative :** réponse mesurable (durée, intensité).
 - o **Continue :** graduelle (HTA chez le chien)
 - o **Discontinue :** intermittente (toux chez le chat)
5. **Evaluation quantitative de l'activité pharmacodynamique :**
 - **La dose efficace 50: DE50 :** Dose qui inhibe l'apparition de 50% du symptôme de la pathologie expérimentale induite chez les animaux de laboratoire.
 - **Détermination :**
 - 1-Induction de la pathologie.
 - 2-Administration de la substance médicamenteuse à l'animal.
 - 3-Mesure du symptôme caractéristique de la pathologie induite.
 - 4-Mesure du % d'inhibition du symptôme par rapport à un lot témoin (administration de plusieurs doses croissantes (D1, D2, D3, D4...) à plusieurs lots de souris (lot1, lot2, lot3, lot4...))



$$\% \text{ d'inhibition} = (S \text{ témoin} - S \text{ essai}) \times 100 / S \text{ témoin}$$

S essai : intensité moyenne du symptôme dans le lot essai.

S témoin : intensité moyenne du symptôme dans le lot témoin.

Toxicologie expérimentale

La toxicologie expérimentale est l'ensemble d'essais qui permettent d'évaluer expérimentalement sur l'animal, la sécurité d'un médicament nouveau et d'apprécier les risques qu'il présente pour l'homme.

Ces essais de toxicité se divisent en deux groupes :

1. Essais pré-requis : dont la réalisation est indispensable avant toute tentative d'administration à l'homme :

- Essais de toxicité par administration unique : **toxicité aiguë**
- Essais de toxicité par administration répétée à court terme : **toxicité subaiguë**
- Essais de **mutagenèse**

2. Essais post-requis : pour lesquels on prend le risque de les réaliser conjointement avec les essais cliniques chez l'homme :

- Essais de toxicité par administration répétée à long terme : **toxicité chronique**
- Essais de **cancérogenèse**
- Essais de tératogenèse (**sur la reproduction**)

I. Essais pré-requis :

I.1. Essais de toxicité par administration unique ou toxicité aiguë :

La toxicité aiguë permet l'évaluation **qualitative** et **quantitative** des phénomènes toxiques et leur évolution dans le temps suite à l'administration d'une **dose unique** de la ou des substances actives contenues dans le médicament.

Généralement on détermine la dose minimale mortelle **DMM** et la dose létale 50 (**DL50**).

a)-Détermination de la dose minimale mortelle DMM :

C'est la dose **minimale** de la substance capable de tuer un animal par administration intraveineuse lente et continue. La quantité injectée au moment de **l'arrêt cardiaque** est la DMM. Cette dose permet de choisir les doses à utiliser pour déterminer la DL50.

b)-Détermination de la dose létale 50 :

❖ **Définition :**

La DL50 est une **estimation statistique** d'une dose unique capable de **tuer** la **moitié** des animaux mis en expérience dans une même espèce animale.

❖ **Protocole expérimental :**

Comme il est impossible d'obtenir immédiatement 50% de morts à partir d'un seul groupe, la méthode consiste à expérimenter sur **6 lots** de **10** animaux auxquels sont administrés des **doses croissantes** de la substance pour que le pourcentage de mortalité varie entre **0 et 100%**.

1. Sélection de l'espèce animale

L'essai peut être effectué sur des mammifères. Habituellement, ce sont les rongeurs (rat ou souris) qui permettent l'extrapolation à l'homme.

2. doses administrées et constitution des lots :

Une gamme de **6 doses** ou plus est sélectionnée.

Le rapport entre deux doses successives doit être compris entre **1.2 et 1.5**.

3. durée d'observation : 14 jours.

❖ **Examens :**

On doit noter l'**heure** de la mort, le **nombre de morts** ainsi que les **symptômes** observés. Une **Autopsie** est obligatoire pour tous les animaux morts au cours de l'essai.

❖ **Calcul de la DL50 : deux méthodes sont utilisées :**

1. Méthode mathématique :

$$DL50 = DL100 - \sum ab / n$$

DL50: dose létale 50 (mg/kg)

DL100 : dose létale 100

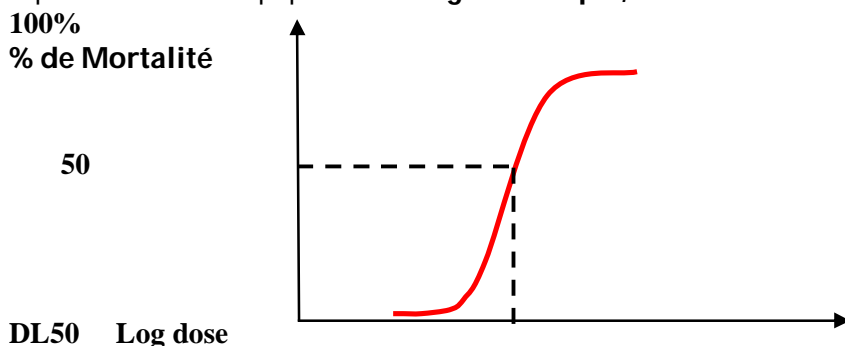
a : différence entre deux doses successives.

b : moyenne de mort entre deux doses successives.

n : nombre moyen d'animaux par lot

2. Méthode graphique :

Les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme décimal des doses utilisées sont représentés sur du papier **semi logarithmique**, on obtient alors une **courbe sigmoïde** :



DL50 Log dose

Graphique montrant la relation dose / mortalité (échelle semi logarithmique)

❖ **exploitation des résultats :** Les résultats de l'essai de toxicité aiguë permettent :

- Evaluation quantitative de la **dose létale**.
- Déterminer la **nature des effets toxiques** aigus.
- Prévoir les **signes cliniques** observés en cas de surdosage aigu chez l'homme.
- Choisir les doses à utiliser pour les épreuves de toxicité par administration répétées.
- Déterminer l'index thérapeutique $IT = \frac{DL50}{DE50}$

1.2. Essais de toxicité par administration répétée à court terme (toxicité subaiguë) :

❖ Protocole expérimental :

1. Choix de l'espèce :

On peut opérer sur **deux espèces de mammifères** : un rongeur, généralement c'est le **rat** et un non rongeur (**chien**).

2. Doses : trois niveaux de doses sont utilisés

- **Dose forte** : elle doit faire apparaître des symptômes de toxicité, mais insuffisante pour tuer l'animal.
- **Dose faible** : sans effets toxique mais produit des effets pharmacodynamiques
- **Dose intermédiaire** : moyenne géométrique des doses précédentes.

3. Fréquence d'administration : administrations **journalières**.**4. Durée de l'essai :** dépend du temps pendant lequel il sera donné à l'homme :

1 ou plusieurs administrations / jour \Rightarrow 2 semaines
 Doses répétées jusqu'à 7 jours \Rightarrow 4 semaines
 30 jours \Rightarrow 3 mois
 Plus de 30 jours \Rightarrow 6 mois

5. Examens :

- Observations générales quotidiennes **du comportement**,
- Contrôle de la **croissance** (évolution pondérale) et de la **consommation alimentaire** (eau et nourriture) qui sont des **indices sensibles** d'effets toxiques.
- **Explorations fonctionnelles** (ECG, ophtalmologie, rénale, hépatiques...)
- **Examens hématologiques et biochimiques** au début, milieu et fin de l'essai
- Comptabilité du **nombre de morts**
- **Examens anatomopathologiques**

❖ Exploitation des résultats :

Les données quantitatives des essais subaiguës ont pour but de déterminer :

- La **dose sans effet observé ou NOEL** « No Observed Effect Level »

C'est la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique significatif, clinique, biologique ou anatomopathologique n'est relevé par rapport aux lots témoins

- La **nature** et le site des effets toxiques (**organes cibles**).

I.3. Essais de mutagenèse :

1. Définition :

Une mutation correspond à une **modification brusque, permanente et transmissible** du génotype par changement dans le nombre ou la qualité des gènes.

2. But des essais de mutagenèse :

L'étude du **pouvoir mutagène** a pour objet de **révéler** ces modifications occasionnées par une substance au matériel génétique de l'individu, ayant pour effet de rendre la descendance différente de l'ascendance de façon permanente et héréditaire.

Ces essais sont exigés pour toute nouvelle molécule à cause de la **relation étroite** entre mutagenèse et cancérogenèse.

En effet, **95 %** des cancers sont d'origine mutagène et comme l'essai de cancérogenèse est long on préfère celui de mutagenèse qui permet un **screening rapide** du pouvoir cancérogène.

3. Les différents types de mutations et les tests correspondants :

Les changements causés au patrimoine génétique peuvent se situer au niveau des gènes, des chromosomes ou du génome :


- Mutation génique
- Aberration chromosomique
- effets sur l'ADN : Défaut de réparation de l'ADN

Description du protocole expérimental :

Les essais de mutagenèses utilisent des **tests in vitro** sur bactéries, levures, cellules de mammifères et des **tests in vivo** sur des insectes et des rongeurs :

A. Essais relatifs aux mutations géniques :

Une mutation génique ou ponctuelle est une **addition ou perte** de paires de bases (puriques ou pyrimidiques) ou **substitution** par une paire erronée dans la molécule d'ADN.

Nouveau gène  nouvelle protéine  nouveau caractère

Test in vitro pour la détection de mutation reverse : Test d'AMES (muta test)

- **Principe** : restaure le gène muté en type sauvage :

On utilise une souche de **Salmonelle typhimurium** porteuse d'une mutation « **His -** » inapte à synthétiser l'histidine (se développe uniquement en milieu riche en histidine) dont la culture en présence **d'agent mutagène** conduit à un retour au **type sauvage** « **His+** » capable de croître en l'absence d'histidine.

- **Avantages :**
 - test simple, rapide (48h), et sensible
 - Son pouvoir prédictif est de 70-90%
- **Inconvénients:**
 - test bactérien: problème d'extrapolation.

II. Essais post-requis :

II.1. Essai de la toxicité répétée à long terme: (toxicité chronique) :

1. Intérêt:

- Compléter les informations sur la toxicité du produit.
- Déterminer les organes cibles (altérations fonctionnelles et anatomopathologiques.)
- Mise en évidence d'effets réversibles et non réversibles.
- Existence ou non d'effets cumulatifs ou retard.
- Enrichir les connaissances cliniques .

2. protocole:

- Espèce : rat+++/chien++/ singe.+
- Sexe : mâle – femelle (nombre égale pour chaque sexe.)
- Voie d'administration : même que la subaigue.

3. Durée d'administration:

rat : 2 ans

Chien / singe : 7 ans ou plus

4.Doses : selon résultats de la subaiguë, usage thérapeutique.

- Examens : les memes que pour la toxicité subaigue
- Résultats et exploitation des résultats:Idem subaiguë : dose sans effet .

II.2.Essai de cancérogenèse:

1.But:

- Evaluer le potentiel cancérigène de:
 - o molécules administrées en chronique: les Anti-HTA.
 - o molécules suspectes lors des premiers essais toxiques.
 - o molécules ayant une analogie structurale avec des produits cancérigènes.

2. Protocole:

- Espèce animale: Souris / rat /hamster
- Age: depuis le sevrage.
- Sexe: mâle – femelle.
- Doses : 3 : forte, faible et intermédiaire
- Voie : celle de l'exposition chez l'homme .
- Durée: 24mois (souris/hamster), 30mois (rat)
- Examens:
 - Biologiques
 - Cliniques
 - Histopathologiques
 - Autopsie : Recherche de tumeurs
- Résultat: Effet du tout ou rien: pas d'effet cancérigène.

II.3.Essais de tératogenèse (essais sur la reproduction) :

Le protocole expérimentale comporte trois niveaux d'investigation: Trois segments.

Segment I: étude sur la fertilité.

Segment II: étude d'embryotoxicité et de foetotoxicité.

Segment III: étude de pré et post natalité.

1. Essais sur la reproduction: segment I (Etude de la fertilité)

- C'est l'étude de l'impact du produit sur les gamètes (stérilité, malformation) males et femelles.
- Sexe: mâles et femelles
- Animal: souris/singe/rat
- Protocole:
 - Traitement pendant toute la durée de la gamétogenèse
 - Croisement d'animaux traités avec ceux non traités
 - Examens: Observation de la gravidité des femelles et observation des nouveaux nés à la recherche de malformations.

2. Essai sur la reproduction :segment II (Embryotoxicité/foeto-toxicité)

- **Sexe** : femelle
- **Animal** : rat /souris
- **Protocole:**
 - Traitement des femelles gravides (pendant toute l'organogenèse)
 - Deux jours avant la mise bas : sacrifice des femelles.
 - Prélèvement des utérus.
 - Recherche de lésions

3. Essai sur la reproduction : segment III(Phase pré et post- natalité):

- Sexe** : femelles gestantes
- Age** : mature
- Animal** : rat / souris
- **Protocole:**
 - Administration du produit quelques jours avant misebas et pendant toute la durée de l'allaitement
 - Recherche d'éventuelles perturbations de la croissance du fœtus, et de la lactation