



HAL
open science

Risque de crises épileptoïdes : méthodes d'évaluation préclinique en pharmacologie de sécurité

Hélène Lê

► **To cite this version:**

Hélène Lê. Risque de crises épileptoïdes : méthodes d'évaluation préclinique en pharmacologie de sécurité. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03179370

HAL Id: dumas-03179370

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03179370>

Submitted on 24 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE MARDI 23 MARS 2021

PAR

Melle Lê Hélène

Né(e) le 23/09/1994
à Toulon (Var)

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**TITRE : Risque de crises épileptoïdes : méthodes
d'évaluation préclinique en pharmacologie de sécurité**

JURY :

Président : Dr Benjamin Guillet

Membres : Dr Jérémy Magalon
Dr Eric Quémeneur

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMACHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Dujé BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse Benjamin Guillet pour sa disponibilité et ses conseils pour la rédaction de ma thèse d'exercice de pharmacie.

Je remercie également les membres de mon jury qui ont accepté de participer à ma soutenance, dont le Dr Jérémy Magalon qui m'avait également encadrée lors de mon stage dans le service de thérapie cellulaire à l'hôpital de La Conception ainsi que le Dr Eric Quémeneur, directeur de recherche scientifique à Transgène qui me fait l'honneur d'évaluer ma thèse d'exercice de pharmacie à Marseille.

Je remercie également mes chères amies de la faculté de pharmacie, avec qui j'ai avancé tout le long de mes études de pharmacie : ma binôme Laurène Minniti et Laura Thiriaux.

Enfin, je remercie ma famille et mon fiancé pour leur soutien le long de ces années et qui me soutiennent encore pour ma thèse actuelle chez Transgène.

Table des matières

I. RAPPEL : ANATOMIE DU SYSTEME NERVEUX ET PHYSIOLOGIE	13
A. GENERALITES	13
B. LES CELLULES DU SYSTEME NERVEUX	13
1. Les neurones	13
2. Les cellules gliales	14
3. Transmission de l'influx nerveux et synapses	16
4. La notion de crises épileptoïdes (ou seizures)	20
II. LA NEUROTOXICITE, ASPECT CLINIQUE ET IMPACT SUR LA SANTE HUMAINE	23
III. PHARMACOLOGIE DE SECURITE : EVALUATION PRECLINIQUE DU CANDIDAT MEDICAMENT	25
A. INTRODUCTION ET DEFINITION :	25
B. RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES ETUDES DE PHARMACOLOGIE DE SECURITE :	26
1. Choix des systèmes d'étude	26
2. Design des études de pharmacologie de sécurité	27
3. Concernant les études in vitro	27
4. La core battery	28
IV. METHODES D'EVALUATION PRECLINIQUE DU RISQUE NEUROBIOLOGIQUE DES CANDIDATS MEDICAMENTS	29
A. LES TESTS REGLEMENTAIRES : LES TESTS NEURO-COMPORTEMENTAUX	29
1. Généralités	29
2. But et applications	30
3. Principe et procédure	31
4. Applications à l'évaluation du risque de crises épileptoïdes	33
5. Avantages et limites	33
B. LES DIFFERENTS TESTS D'EVALUATION DU RISQUE DE CRISES EPILEPTOIDES	34
1. Liste exhaustive résumant les différents tests pour l'évaluation du risque de crises épileptoïdes et du potentiel convulsivant	34
2. Les tests in vitro	35
3. Les tests in vivo	52

V. UNE APPROCHE POUR EVALUER LE RISQUE DE CRISES EPILEPTOIDES	63
VI. DISCUSSION ET CONCLUSION	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	73
ANNEXE	77
SERMENT DE GALIEN	78

Liste des abréviations

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

PA : Potentiel d'Action

PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur

PPSI : Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur

NMDA : N-methyl-D-aspartate

AMPA: α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate

GABA : acide γ -aminobutyrique

EEG : électro-encéphalogramme

ICH : International Council for Harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use

FOB: Functional Observational Battery

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

SPS : Société de Pharmacologie de Sécurité

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

PK : Pharmacocinétique

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

h-ERG : human Ether-à-go-go-Related Gene

AM : AcétoMéthyleester

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

OAT : Organic Anion Transporter

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

IPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells

PS: Population Spikes

CNQX: Cyanquixaline

PTZ: PentylèneTétraZole

MEA : MultiElectrodes Array

ICV : IntraCérébroVentriculaire

IP : Intra-Péritonéale

DMT : Dose Maximale Tolérée

q.EEG : Electroencéphalogramme Quantifié

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

ADME : Absorption Distribution Métabolisme Elimination

DMPK : Drug Metabolism and Pharmacokinetics

CHMP : Comité des Médicaments à usage Humain

IMAO-A : Inhibiteurs de la Mono-Amine Oxydase-A

I. RAPPEL : ANATOMIE DU SYSTEME NERVEUX ET PHYSIOLOGIE

A. GENERALITES

Le système nerveux est divisé en deux grandes zones : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Dans le SNC, sont situés l'encéphale (ou cerveau) et la moelle épinière. Dans le SNP, sont retrouvés les ganglions nerveux ainsi que les nerfs. Il y a 2 types de nerfs : les nerfs crâniens (12 paires) et les nerfs rachidiens (31 paires). Deux voies constituent le SNP, la première est la voie sensitive (ou afférente) qui permet de véhiculer des informations externes originaires des récepteurs périphériques de la sensibilité ou de la douleur. La deuxième est la voie motrice (ou efférente) qui permet de transmettre les informations motrices du SNC jusqu'en périphérie¹.

B. LES CELLULES DU SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux est composé de deux principaux types cellulaires que sont les neurones et les cellules gliales.

1. LES NEURONES

10% des cellules du système nerveux sont des cellules neuronales, cellules indispensables du système nerveux. Les neurones sont des cellules excitables et constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux sous forme de réseau. Ils sont composés d'un corps cellulaire (soma ou péricaryon) qui contient les mêmes organites qu'une autre cellule et des neurofibrilles, ayant pour rôle la communication intracellulaire. En effet, les neurones sont attribués à des réseaux qui sont capables de recevoir ou transmettre un signal et ainsi de coordonner une fonction complexe. Les neurones comportent un corps cellulaire permettant la synthèse d'une majorité des constituants nécessaires à la structure et aux fonctions de la cellule neuronale. Du corps cellulaire, prennent naissance des fibres nerveuses (dendrites et axones). Les dendrites sont des prolongements fins du corps cellulaire qui reçoivent le signal nerveux émis par d'autres neurones. L'axone est un prolongement unique qui a pour origine le cône d'implantation (ou cône d'émergence) (cf schéma²).

La communication entre deux neurones passe par des zones de contacts spécifiques dites « synapses ». C'est dans la synapse que les neurones libèrent des neurotransmetteurs suite à l'émission d'un signal électrique ayant circulé le long de l'axone. Ce signal électrique est connu sous le terme de potentiel d'action.

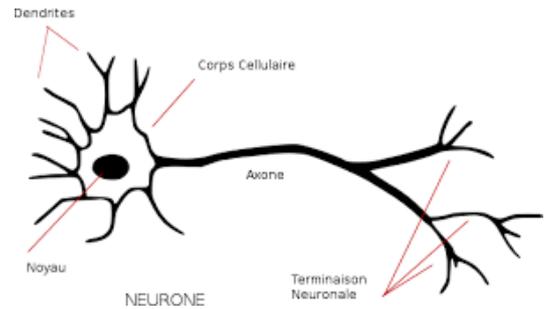
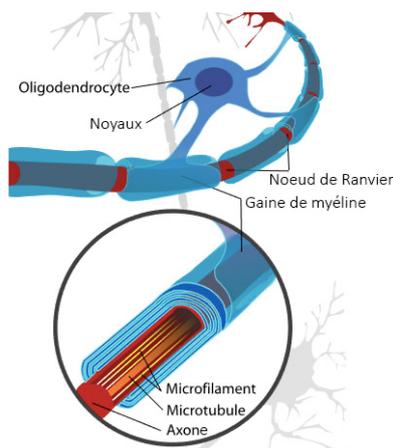


Figure 1. Schéma d'un neurone



Pour augmenter la vitesse de transmission de l'influx nerveux, les axones sont recouverts de gaine de myéline et présentent par intermittence de 1 ou 2 mm des nœuds de Ranvier, qui sont amyéliniques. Selon la localisation de la gaine de myéline dans le SN, différentes cellules forment celle-ci : des oligodendrocytes (cf schéma³) pour le SNC et des cellules de Schwann pour le SNP^{1 4}.

Figure 2. Oligodendrocytes (gaine de myéline du SNC)

2. LES CELLULES GLIALES

90% des cellules du système nerveux sont des cellules gliales. Contrairement aux neurones, les cellules gliales ont la capacité de se reproduire par mitose, voire proliférer et devenir cancéreuses (glioblastome). Elles ne sont cependant pas excitables mais elles présentent plusieurs rôles physiologiques, au sein d'un réseau actif de neurones, notamment un rôle de support trophique et métabolique pour les neurones. Elles permettent également la survie et différenciation neuronale, la croissance des neurites et la synaptogenèse.

Les cellules gliales, dans le SNC, sont subdivisées en 4 différents types cellulaires ayant des fonctions différentes : oligodendrocytes, microglie, cellules épendymaires et astrocytes⁵.

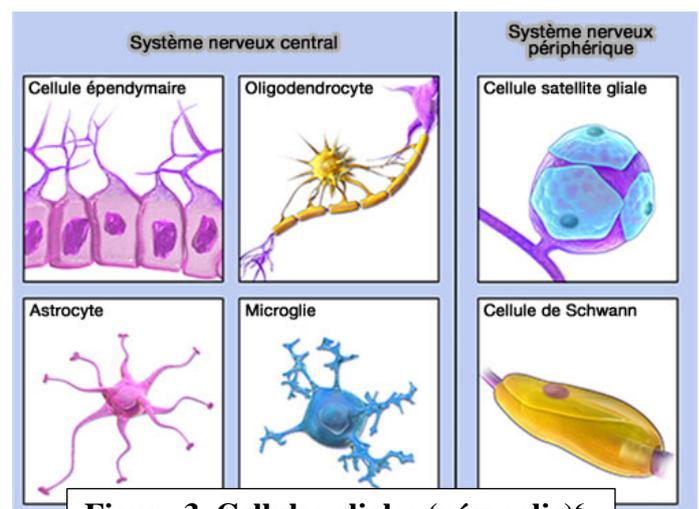


Figure 3. Cellules gliales (névroglie)⁶

Dans le SNP, les cellules gliales sont subdivisées en 3 différents types cellulaires : les cellules de Schwann qui participent à la myélinisation des axones du SNP, les cellules satellite gliales et les cellules gliales entériques.

SNC	Astrocytes	Les astrocytes sont les cellules gliales les plus majoritaires dans le SNC et ont un rôle de support vis-à-vis des neurones. Ils présentent de nombreux rôles indispensables aux neurones : support trophique et métabolique des neurones, survie et différenciation des neurones, croissance des neurites (axones et dendrites), participation aux fonctions synaptiques (homéostasie, régulation des concentrations ioniques et en neurotransmetteurs).
	Oligodendrocytes	Les oligodendrocytes produisent la myéline pour les axones du SNC.
	Cellules épendymaires	Les cellules épendymaires sont retrouvées dans la moelle épinière et dans le système ventriculaire. Elles produisent le liquide céphalorachidien qui a comme rôle, de protéger l'encéphale et la moelle épinière.
	Cellules microgliales	Les cellules microgliales (constituant 20% des cellules gliales du SNC) participent à la protection des neurones grâce à leur propriété de phagocytose. Elles phagocytent les neurones endommagés et participent au maintien de l'homéostasie du SNC avec les astrocytes.
SNP	Cellules de Schwann	Les cellules de Schwann produisent la myéline pour les axones du SNP.
	Cellules satellites gliales	Les cellules satellites gliales sont situées au niveau des neurones des ganglions sensoriels, sympathiques et parasympathiques (système nerveux autonome).
	Cellules gliales entériques	Les cellules gliales entériques sont situées dans les ganglions intrinsèques du système digestif.

Table 1. Tableau récapitulatif des cellules du système nerveux^{5 6 7 8}

Les cellules gliales ont un rôle de support pour les neurones mais constituent aussi un réseau avec les neurones qui participe activement aux fonctions du système nerveux⁵.

3. TRANSMISSION DE L'INFLUX NERVEUX ET SYNAPSES

Potentiels et influx nerveux

Les neurones communiquent entre eux grâce à des influx nerveux, qui sont des potentiels électriques. Ces potentiels d'action se déplacent sur l'axone, après stimulation du neurone. La transmission du potentiel s'effectue dans le sens dendrites-axones. Les ramifications dendritiques constituent le pôle récepteur du neurone, l'axone représente le pôle émetteur du neurone.

- Potentiel de repos

Sur la membrane des neurones se trouvent des canaux ioniques qui assurent les flux d'ions positifs ou négatifs entre l'espace intracellulaire et l'espace extracellulaire. L'espace intracellulaire est généralement plus négatif que l'espace extracellulaire. Le potentiel de membrane neuronal est de l'ordre de -70 mV. Ce potentiel est variable selon les influx nerveux qui circulent sur les axones. Ces influx nerveux peuvent être d'ordre excitateurs ou inhibiteurs (selon le type de neurotransmetteurs qui sont libérés), permettant ainsi de générer ou d'inhiber un potentiel d'action (PA)⁹.

- Potentiel d'action (PA)

Le PA est défini par une variation transitoire du potentiel membranaire qui survient après le passage d'un influx nerveux sur l'axone, et dont l'intensité ne diminue pas avec la distance. La génération d'un PA débute lorsque la stimulation du neurone est suffisante, c'est-à-dire, lorsque la somme des influx positifs et négatifs amène le potentiel membranaire à -50 mV, c'est le potentiel seuil. Si par exemple, le potentiel membranaire passe de -70 mV à -60 mV, il n'y aura pas génération d'un PA selon la loi du tout ou rien, auquel le PA est soumis.

Le PA s'effectue en plusieurs étapes. Une fois le potentiel seuil franchi, la dépolarisation continue grâce à l'ouverture des canaux sodiques Na^+ laissant entrer les ions Na^+ dans le neurone post-synaptique, ce qui réduit le potentiel membranaire. La dépolarisation se poursuit

jusqu'à +40 mV. A ce stade, les canaux sodiques Na^+ se referment, alors que les canaux potassiques K^+ s'ouvrent. L'hyperpolarisation commence avec une sortie d'ions K^+ dans la fente synaptique, entraînant à une augmentation de la différence de potentiel membranaire (supérieure à la différence de potentiel de repos). Les pompes Na^+/K^+ interviennent afin de rééquilibrer les concentrations ioniques à celles présentes au potentiel de repos (sortie des ions Na^+ dans la fente synaptique et rentrée d'ions K^+ dans le neurone)¹⁰.

Après un premier PA, le neurone ne peut pas ré-initier un second PA de façon immédiate. En effet, il existe une période réfractaire durant laquelle l'axone ne peut plus propager de potentiel d'action. Selon le premier potentiel d'action, il y a deux types de périodes réfractaires possibles :

- Période réfractaire « absolue » où aucune stimulation nouvelle n'est possible.
- Période réfractaire « relative » qui succède la période réfractaire absolue jusqu'à l'établissement du potentiel de repos. Dans cette période, une stimulation nouvelle est possible, à condition que l'amplitude du stimuli soit suffisante pour amener le potentiel membranaire au potentiel seuil¹⁰.

Le potentiel d'action est un élément indispensable dans la communication entre les neurones.

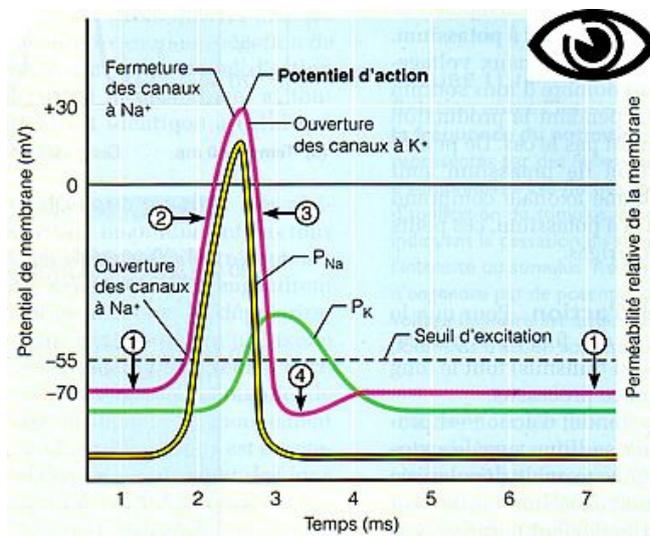


Figure 4. PA neuronal¹⁰

Neurotransmission

Comme mentionné dans la définition des neurones, ceux-ci communiquent entre eux par le biais d'une synapse, qui correspond à un point de connexion fonctionnel entre deux neurones : un

neurone présynaptique où l'influx nerveux aboutit et un neurone postsynaptique qui reçoit l'information du neurone présynaptique.

Il existe deux types de synapses :

- Synapses électriques : elles sont retrouvées dans de nombreux tissus de l'organisme et correspondent à des jonctions de type GAP (ou nexus)
- Synapses chimiques : elles ne sont retrouvées que dans les tissus nerveux et peuvent être classées selon la nature des cellules impliquées.
 - Synapses neuro-neuronale, soit la jonction entre deux neurones ;
 - Synapses neuro-effectrices, soit la jonction entre un neurone qui est moteur et une cellule effectrice ;
 - Synapses sensori-neuronales, soit la jonction entre des cellules sensorielles et des neurones.

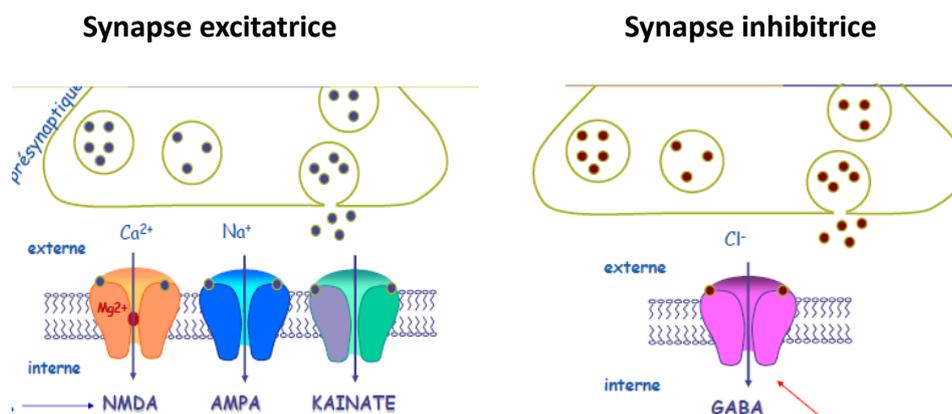


Figure 5. Schéma d'une synapse excitatrice (gauche) et d'une synapse inhibitrice (droite)

Dans le cas des synapses chimiques, la neurotransmission s'effectue par la libération de vésicules synaptiques par le neurone présynaptique, dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs, contenus dans les vésicules synaptiques sont synthétisés par différentes enzymes dans le bouton synaptique. Cette synthèse requiert une énergie importante et par conséquent, un nombre important de mitochondries. Afin d'éviter leur dégradation, il est nécessaire de stocker ces neuromédiateurs dans les vésicules synaptiques.

Après l'étape de libération des neuromédiateurs, vient l'étape de fixation de ces derniers sur les récepteurs de la membrane du neurone post-synaptique. Il peut y avoir deux types de récepteurs post-synaptiques :

- Ionotropiques : les récepteurs sont des canaux ioniques, le neurotransmetteur qui a été émis exerce une action directe sur ces canaux.
- Métabotropiques : les récepteurs de ce type exercent une action indirecte sur les canaux ioniques (par le biais d'un second messenger).

Enfin, une fois les neuromédiateurs fixés sur leur récepteur, ils doivent être éliminés de la fente synaptique, soit par l'acétylcholinestérase qui va dégrader l'acétylcholine, soit par réabsorption des neuromédiateurs ou soit par diffusion hors de la fente synaptique¹.

A propos des neurotransmetteurs, selon leur nature et leurs récepteurs cibles, le courant généré peut être d'ordre excitateur, connu sous le terme de Potentiel Post-Synaptique Excitateur (PPSE) ou bien d'ordre inhibiteur, soit Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur (PPSI).

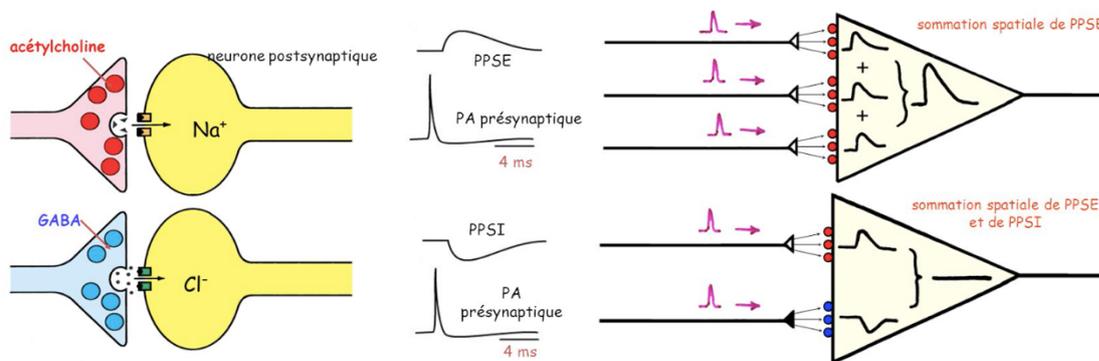


Figure 6. Schéma présentant la génération de PPSE et PPSI

Chaque neurone reçoit des PPSE et des PPSI, dont la sommation spatio-temporelle conduit à la génération ou pas d'un PA par le neurone post-synaptique¹⁰. Par exemple, si les PPSE sont plus importants que les PPSI, le neurone post-synaptique se dépolarise au-dessus du seuil qui conduira à un influx nerveux.

Dans ce tableau, sont cités les principaux neurotransmetteurs du SNC qui peuvent être impliqués dans le risque épileptoïde et dans la pathologie épileptique :

Acides aminés	Glutamate	Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC. Il exerce ses fonctions à travers des récepteurs ionotropiques : N-méthyl-D-aspartate (NMDA), Kainate et α -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionate (AMPA).
---------------	-----------	--

	GABA	L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Il exerce une action directe en se fixant sur les récepteurs GABA-A ou une action indirecte en se fixant sur les récepteurs GABA-B.
Amines	Noradrénaline	La noradrénaline est une amine excitatrice ou inhibitrice selon sa liaison à un récepteur. Elle se lie sur les récepteurs adrénergiques.
	Dopamine	La dopamine est une amine excitatrice ou inhibitrice selon sa fixation à un récepteur. Elle se lie sur les récepteurs dopaminergiques.
	Sérotonine	La sérotonine est un neurotransmetteur excitateur principalement.
Neurotransmetteur	Acétylcholine	L'acétylcholine a une action excitatrice lorsqu'elle se lie aux récepteurs nicotiques et a une action excitatrice ou inhibitrice selon le récepteur muscarinique auquel elle se lie.
Peptides	Adénosine	L'adénosine est impliquée dans plusieurs pathologies (ischémie, pathologies neurodégénératives comme l'Alzheimer, Parkinson et l'épilepsie).

Table 2. Les principaux neurotransmetteurs du système nerveux^{10 11}

4. LA NOTION DE CRISES EPILEPTOÏDES (OU SEIZURES)

a. Crises épileptoïdes (ou seizures)

Définition

Une crise est définie par une décharge anormale, excessive, hypersynchrone et transitoire d'une population neuronale. Généralement, la durée des crises est brève mais peut être prolongée et continue comme dans le cas du *status epilepticus*. Il est à noter que les crises ne se manifestent pas toujours au niveau clinique ; par exemple, au niveau périphérique, des contractions musculaires sont le plus souvent retrouvées (convulsions).

Il n'y aura pas eu de symptomatologie, mais les crises pourront être caractérisées sur un électro-encéphalogramme (EEG) ou bien à travers l'activité calcique; il s'agit des « crises épileptoïdes ». Afin de mieux définir ces crises, nous allons voir la définition de l'épilepsie.

L'épilepsie (\neq crises épileptoïdes) est définie comme un désordre neuronal qui est due à une prédisposition à générer des crises prenant en compte les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales qui suivent les crises. Ainsi, si les crises épileptoïdes surviennent plus d'une fois, elles peuvent mettre l'accent sur la mise en place d'un processus épileptique^{12 13}. Dans le cadre de ma thèse, nous nous intéresserons uniquement au risque de crises épileptoïdes, un effet neurotoxique majeur parmi les effets indésirables rencontrés dans le SNC.

Conséquences en clinique des crises épileptoïdes

Les crises induites par la prise de médicaments représentent 1,7-14% des crises aiguës symptomatiques reportées en 2014. Les complications qui en découlent sont variées selon la région du cerveau concernée : troubles visuels, picotements, changements d'humeur, *status epilepticus*, mort neuronale. Il est donc important de prévenir le risque d'apparition de crises, induit par la prise de médicaments, avant de développer une symptomatologie menaçante¹⁴.

Les crises se réfèrent à une activité électrique neuronale qui est rythmique, synchrone et anormale pouvant être accompagnées par des changements de comportements (convulsions)¹⁵.

b. La physio-pathologie des crises épileptoïdes

Une façon d'expliquer la survenue de crises épileptoïdes est le déséquilibre dans la balance excitation et inhibition¹². Les crises résultent d'une réponse inhibitrice inadéquate (GABA) ou d'une stimulation excitatrice excessive (influencée par le glutamate) bien que d'autres neurotransmetteurs jouent un rôle, le tout menant à un désordre électrique et altérations de synchronisation. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur prédominant dans le cerveau et le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux.

Lorsqu'il y a des crises, il y a une élévation des concentrations extracellulaires en glutamate qui peut favoriser l'état d'excitotoxicité¹⁶. L'excitation commence lorsque les PAs, médiés par les canaux voltage-dépendants sodiques et potassiques envahissent le neurone pré-synaptiques, ainsi les canaux voltage-dépendants calciques sont activés. Le calcium entre dans le neurone

pré-synaptique, via les canaux voltage-dépendants calciques, et stimule la libération de glutamate, contenue dans les vésicules synaptiques. Le glutamate diffuse ensuite dans la fente synaptique pour activer les récepteurs AMPA, qui vont générer le PPSE, allant jusqu'au second messager qui est le calcium. C'est ce calcium qui est observé lors des oscillations calciques.

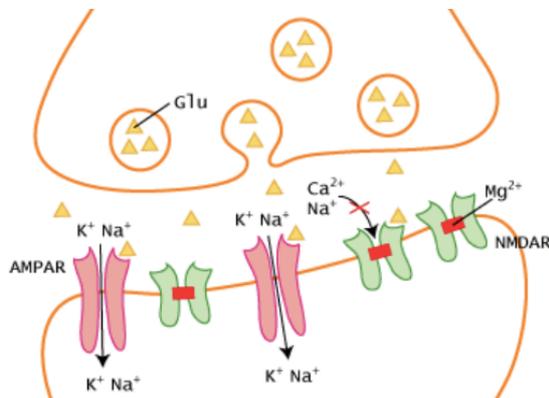


Figure 6. Synapse glutamatergique et ses 3 récepteurs (KAINATE, AMPA-R, NMDA-R)

Il existe 3 grands types de récepteurs au glutamate : NMDA, AMPA et Kainate. Ces 3 récepteurs sont essentiellement situés sur la membrane post-synaptique du neurone comme illustrés ci-dessus. Ce sont des récepteurs ionotropiques qui répondent par une excitation post-synaptique, suite à la liaison du glutamate sur son site de liaison, et, qui ont tous trois, des rôles différents, mais nous nous intéresserons plus au récepteur NMDA. Ce récepteur possède quelques particularités : l'ouverture du canal requiert la présence d'un co-agoniste (la glycine) et une exposition faible aux ions magnésiums Mg²⁺.

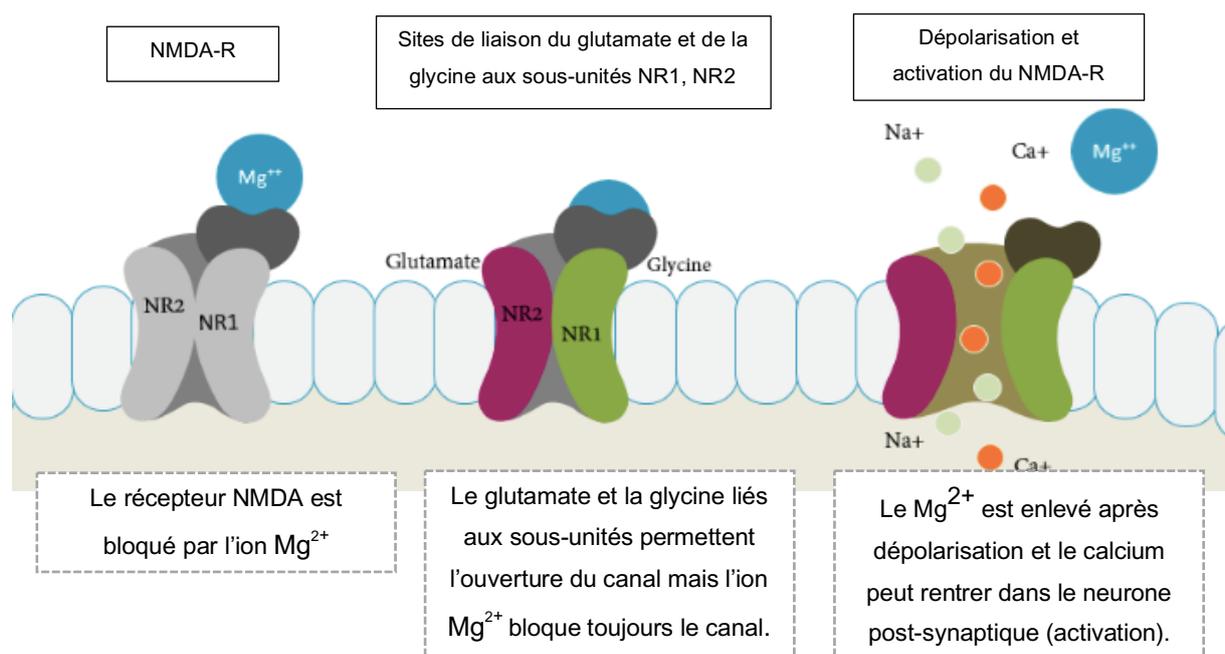


Figure 7. Activité du récepteur NMDA¹⁷

En effet, les ions Mg^{2+} peuvent bloquer le canal calcique à l'état d'hyperpolarisation (soit au potentiel de repos). Le récepteur NMDA permet le passage de cations seulement lorsque le Mg^{2+} est enlevé de son site de liaison. Pour cela, il faut une dépolarisation suffisamment importante du neurone post-synaptique afin de libérer le récepteur NMDA du magnésium¹⁸. La dépolarisation du neurone post-synaptique suite à l'activation soutenue des récepteurs AMPA va permettre le retrait du magnésium et l'entrée de calcium dans la cellule. Ce récepteur s'active donc après le récepteur AMPA. Le calcium joue un rôle essentiel dans l'activité neuronale, en effet, il influence de nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la différenciation et l'activité synaptique. Cependant, un afflux excessif d'ions Ca^{2+} dû à une concentration extracellulaire de glutamate trop importante peut déréguler les processus cellulaires et amener à l'apparition de crises qui va favoriser l'état d'excitotoxicité¹⁹.

II. LA NEUROTOXICITE, ASPECT CLINIQUE ET IMPACT SUR LA SANTE HUMAINE

Lors du développement pharmaceutique, l'évaluation de la sécurité non clinique des candidats médicaments est évaluée au moment des études de toxicologie et de pharmacologie de sécurité. La toxicologie se concentre plus particulièrement sur les effets lésionnels, soit sur la structure de l'organe suite aux effets d'une molécule. Cette discipline permet d'évaluer les doses maximums tolérables, les organes cibles du candidat médicament, les fonctions physiologiques altérées, la relation entre la dose et l'effet, la dose sans effets indésirables observables (*No observable adverse effect level* NOAEL) mais aussi la réversibilité des effets.

Concernant la pharmacologie de sécurité, elle se concentre sur la recherche d'activités indésirables d'ordre fonctionnel des médicaments, soit sur la fonction d'un organe suite aux effets indésirables d'une molécule. Dès les années 2000, la pharmacologie de sécurité est devenue une discipline complémentaire à la toxicologie grâce à la publication des lignes directrices ICH S7A (en 2001) et ICH S7B (en 2005), qui détaillent les études de pharmacologie de sécurité concernant le développement de médicaments appliqués à l'Homme. Les études de pharmacologie de sécurité dans les systèmes respiratoires, nerveux et cardiovasculaires sont depuis intégrées aux études de toxicologie ; elles permettent d'apporter plus de sensibilité (en augmentant la puissance statistique) aux études de toxicologie qui requiert un nombre important d'animaux, de réduire le nombre d'animaux nécessaires dans les études de toxicologie générale

et potentiellement le coût (si par exemple, les études de toxicologie incluent le test *Functional Observational Battery* (FOB) et l'évaluation du système respiratoire)²⁰.

Les études de sécurité précliniques sont aussi abordées dans la ligne directrice ICH M3 (R2), qui mentionne la conduite d'études de sécurité non cliniques pour déboucher sur les essais cliniques chez l'Homme et obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM), conformément aux principes des 3R (réduire, raffiner et remplacer). Le texte ICH M3 a été révisée en 2009 et est devenue l'ICH M3 (R2). Cette ligne directrice permet de déterminer, entre autres, la première dose à administrer chez l'Homme au cours de la phase clinique I.

Assurer la sécurité des médicaments est primordiale au cours de leur développement, mais aussi après la mise sur le marché où des effets indésirables peuvent apparaître du fait de la population différente de celle testée au cours des études cliniques ou encore de la polymédication de certains patients. L'identification de problèmes concernant la sécurité au cours du développement peuvent causer des retards dans la mise sur le marché du candidat-médicament engendrant des surcoûts mais surtout, peuvent causer des échecs. La sécurité est une cause majeure d'attrition à un stade avancé du développement. Sur le SNC, le taux d'attrition dû à la neurotoxicité est relativement faible en préclinique mais s'accélère dès la rentrée en phase I du développement clinique²¹.

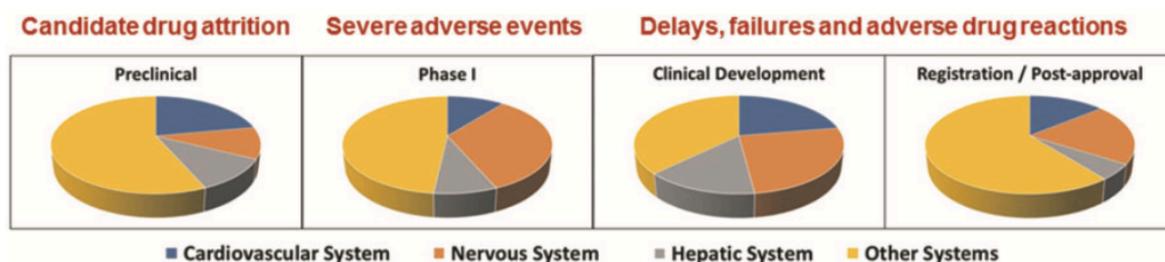


Figure 8. Les effets indésirables par organe au cours du développement pharmaceutique²¹.

Une des explications concernant l'implication de la neurotoxicité dans le taux d'attrition des médicaments est la complexité du système nerveux. En effet, les cellules du système nerveux possèdent de nombreuses fonctions qui ne sont pas bien récapitulées sur les modèles *in vitro*, de plus, la compréhension des processus biochimiques observés au cours des effets neurotoxiques est limitée²¹. De plus, le risque de crises épileptoïdes (ou *seizures*) constitue un effet indésirable potentiellement grave mais surtout, figure parmi les effets indésirables les plus courants du SNC selon une enquête industrielle réalisée par la société de pharmacologie de sécurité (SPS)^{22 23}.

L'évaluation de la toxicité dans le SNC au cours du développement pharmaceutique est une étape vitale et obligatoire dans les études de pharmacologie de sécurité. En effet, les études de pharmacologie de sécurité sont inscrites dans un cadre réglementaire, les industriels de santé sont obligés de réaliser ces études. Cependant, pour l'évaluation du risque de crises épileptoïdes, il n'y a pas à ce jour de *guidelines* officielles concernant les tests à utiliser²². De les études de pharmacologie de sécurité sur le SNC sont conduites relativement tardivement dans le développement d'un médicament²⁴.

Pour des raisons d'éthique et de sécurité, ces effets indésirables doivent être détectés le plus tôt possible, en particulier avant l'arrivée en phase clinique. Comme nous venons de le voir, cette détection passe par la réalisation des études de pharmacologie de sécurité qui sont décrites dans les lignes directrices ICH S7A, ICH S7B et ICH M3 (R2), notamment par la réalisation d'études *in vivo* réglementaires (pour l'évaluation de la sécurité dans le SNC, le test réglementaire est le test d'Irwin qui se fait sur des animaux)²⁵. Nous verrons que des études *in vitro* existent afin de compléter et orienter les études *in vivo*, mais ne peuvent en aucun cas se substituer aux tests *in vivo*.

III. PHARMACOLOGIE DE SECURITE : EVALUATION PRECLINIQUE DU CANDIDAT MEDICAMENT

A. INTRODUCTION ET DEFINITION :

Les premières notions concernant la pharmacologie de sécurité sont apparues dans les ICH M3 « *Timing of Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals* » et S6 « *Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals* » pour appuyer l'utilisation thérapeutique des candidats médicaments chez l'Homme. Les détails tels la définition et objectifs de la pharmacologie de sécurité ont été laissés en suspens.

La pharmacologie de sécurité apparaît par la suite comme un élément règlementaire essentiel dans le développement préclinique des médicaments. Elle est obligatoire pour étudier les potentiels effets indésirables sur les fonctions vitales de l'organisme que sont le système cardiovasculaire, le système nerveux et le système respiratoire. Cette batterie de tests à réaliser est appelée « *Core battery* » dans la ligne directrice ICH S7A.

La pharmacologie de sécurité prend en compte les effets observés au cours des études de :

- Pharmacologie primaire (qui étudie le mécanisme d'action principal des substances pharmacologiques)
- Pharmacologie secondaire (qui étudie les mécanismes d'action secondaires des substances pharmacologiques)

En effet, les effets indésirables observés au cours des études de pharmacologie de sécurité sont souvent dus à l'interaction entre un ligand et un récepteur.

Objectifs des études de pharmacologie de sécurité :

La pharmacologie de sécurité a pour principal but de détecter de manière précoce, les effets indésirables potentiels afin d'assurer la sécurité des patients. Ces études permettent ainsi :

- D'identifier les effets indésirables pharmacodynamiques d'une substance, pouvant être relevant chez l'Homme ;
- D'évaluer les effets indésirables pharmacodynamiques et/ou physiopathologiques d'une substance survenant lors des études de toxicologie et/ou aux études cliniques ;
- D'investiguer les mécanismes des effets indésirables d'ordre pharmacodynamique ayant été observés et/ou suspectés.

La détection précoce des effets indésirables nécessite de réaliser des études précliniques décrites en grande majorité dans les lignes directrices ICH S7A, ICH S7B et ICH M3(R2) en tant qu'études *in vivo* obligatoires. Des études *in vitro* peuvent aussi être conduites afin de compléter et orienter les études *in vivo*, mais elles ne peuvent en aucun cas les remplacer.

B. RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES ETUDES DE PHARMACOLOGIE DE SECURITE :

1. CHOIX DES SYSTEMES D'ETUDE

Les études pharmacologie de sécurité doivent être conçues et élaborées en considérant plusieurs facteurs. D'une part, les effets indésirables propres à la classe thérapeutique de la substance selon son mécanisme d'action et d'autre part, les effets indésirables indépendants du mécanisme d'action. De plus, les données obtenues lors des études de liaison et des études enzymatiques peuvent suggérer des effets indésirables potentiels.

Le choix du modèle animal ou des autres tests doit être pertinent et doit permettre d'obtenir une information scientifiquement valide. Plusieurs critères de sélection sont pris en compte : le profil de pharmacocinétique, l'espèce, le sexe, l'âge de l'animal, la sensibilité et reproductibilité et le recul des données du système utilisé pour l'expérimentation. Lorsque des données existent chez l'Homme, comme les données concernant le métabolisme *in vitro*, celles-ci doivent être incluses dans les critères de sélection d'un modèle. Lors de la rédaction du dossier d'AMM, il est indispensable de justifier le choix de l'espèce animale ou du système utilisé lors des études de pharmacologie de sécurité.

2. DESIGN DES ETUDES DE PHARMACOLOGIE DE SECURITE

En règle générale, la voie d'administration utilisée sur les animaux doit être la même que celle prévue au moment des essais cliniques. Les études de pharmacologie de sécurité permettent de définir la relation concentration-effet ou dose-effet d'un effet indésirable qui a été observé.

Concernant le choix des doses à tester, les doses où des effets indésirables sont observés devraient être comparées aux doses où un effet pharmacodynamique est observé chez l'espèce testé ou bien, à l'effet thérapeutique voulu chez l'Homme. Il est reconnu qu'il existe des différences de sensibilité au niveau pharmacodynamique selon l'espèce.

Les doses doivent ainsi comprendre les doses thérapeutiques ainsi que les doses supra-thérapeutiques. S'il n'y a pas d'effets indésirables observés dans les études de pharmacologie de sécurité, la plus forte dose devrait être une dose qui produise un effet indésirable modéré observé au cours d'une autre étude de la molécule testée.

3. CONCERNANT LES ETUDES *IN VITRO*

Les études *in vitro* sont conçues afin d'établir un profil effet-concentration. Les concentrations testées doivent être choisies afin d'augmenter le seuil de détection d'un effet sur le système. Lors des études de pharmacologie de sécurité, la substance est généralement administrée en dose unique.

4. LA CORE BATTERY

L'ICH S7A définit les études de pharmacologie de sécurité où il s'agit de rechercher les effets pharmacodynamiques de la molécule testée sur les fonctions vitales de l'organisme. Les fonctions vitales considérés dans la « *core battery* » sont les systèmes cardiovasculaire et respiratoire et le SNC.

a. SNC

Les paramètres auxquels la *guideline* ICH S7A demandent de l'intérêt d'être évalués au niveau du SNC sont l'activité motrice, les changements de comportements, la coordination, les réponses sensitives et motrices et la température corporelle. Par exemple, les tests d'observation fonctionnelle (FOB) ou d'Irwin sont appropriés pour l'étude des effets indésirables dans le SNC.

b. Système cardiovasculaire

Les paramètres auxquels la *guideline* ICH S7A demandent de l'intérêt d'être évalués au niveau du système cardiovasculaire sont la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'activité électrique au niveau du cœur. Des études *in vivo*, *in vitro* et/ou *ex vivo* incluant une évaluation hémodynamique doivent être considérés pour l'étude des effets indésirables dans le système cardiovasculaire.

c. Système respiratoire

Les paramètres auxquels la *guideline* ICH S7A demandent de l'intérêt d'être évalués au niveau du système respiratoire sont la fréquence respiratoire et d'autres mesures de la fonction respiratoire (par exemple, le volume tidal ou le taux de saturation en oxygène). Une observation clinique d'espèces animales n'est pas recommandée pour évaluer la fonction respiratoire, celle-ci doit être évaluée grâce à des tests adaptés (par exemple la pléthysmographie qui peut mesurer les explorations fonctionnelles respiratoires)

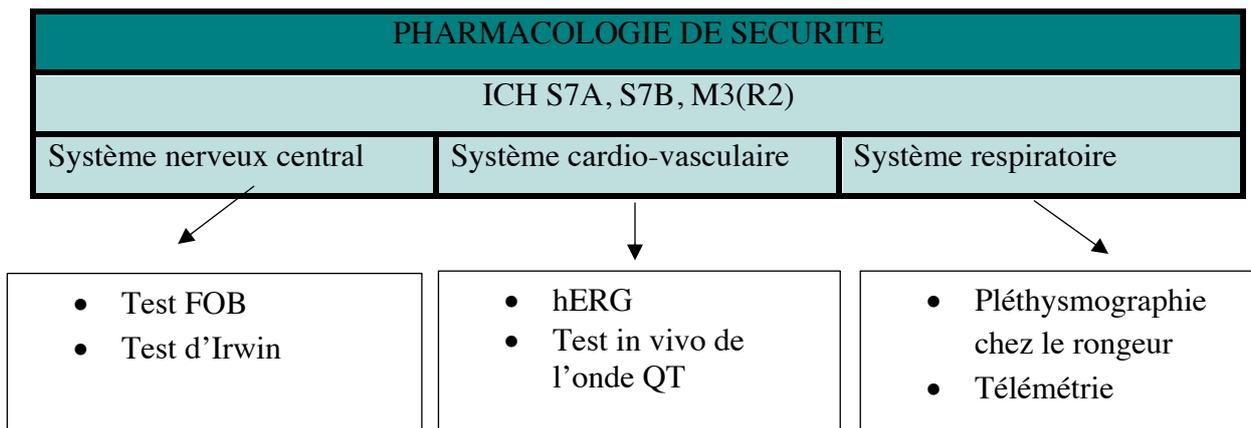


Figure 9. Core-battery décrite dans la guideline ICH S7A

La pharmacologie de sécurité peut s'appliquer aux autres systèmes physiologiques (système rénal, système gastro-intestinal etc...) si l'on considère une population de patients cibles (par exemple la fonction rénale pour les patients atteints d'hypertension ou le système immunitaire pour les patients immunodéprimés) ainsi que la première partie des études de pharmacodépendance.

Les études de pharmacologie de sécurité doivent être réalisées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) afin d'assurer la qualité ainsi que la fiabilité de ces études. Les résultats obtenus au cours de ces études peuvent être utilisés dans les études de toxicologie, il y a donc un intérêt de conduire les études de pharmacologie de sécurité selon les BPL.

IV. METHODES D'EVALUATION PRECLINIQUE DU RISQUE NEUROBIOLOGIQUE DES CANDIDATS MEDICAMENTS

A. LES TESTS REGLEMENTAIRES : LES TESTS NEURO-COMPORTEMENTAUX

1. GENERALITES

Les tests d'évaluation de la sécurité dans le SNC devraient être capables de tester plusieurs aspects sur un même animal (comportement en général, activité locomotrice, coordination motrice). Les tests décrits dans les lignes directrices ICH S7A sont le test d'Irwin et la batterie d'observations fonctionnelles dit « test FOB » qui sont des tests neuro-comportementaux²⁵.

Le test d'Irwin a été originellement décrit en 1968, en application pour les souris. Finalement, en 1988, ce test a été adapté pour des rats par Esteve et Al.. La différence entre ces deux tests est subtile. Le test FOB est considéré comme équivalent au test d'Irwin (par les *guidelines* ICH S7A) mais a l'avantage de ne pas être restreint aux souris (applicabilité à d'autres animaux comme les souris, chiens, cochons d'Inde ou primates non humains²⁰) et constitue même la base des observations de troubles neurocomportementaux chez l'Homme. Ce test est obligatoire dans l'évaluation de la sécurité des candidats médicaments mais n'est pas standardisé. Chaque laboratoire définit les paramètres qu'il étudie au cours de ce test. L'ICH S7A a pour exigences d'observer les animaux de manière systématique et de leur administrer des intervalles larges de doses²⁶.

Le test d'Irwin et FOB peut être couplé à la prise de température corporelle de l'animal afin d'observer si d'éventuelles hypothermies ou hyperthermies surviennent²⁷.

2. BUT ET APPLICATIONS

Le test d'Irwin est utilisé pour évaluer de manière qualitative, les effets des candidats médicaments sur le comportement et la fonction physiologique, à partir de la dose où un effet est observé jusqu'à la dose où une neurotoxicité est observée. Dans ce test, les modifications comportementales, physiologiques et tout signe de neurotoxicité sont reportés, mais également la température rectale et le diamètre des pupilles. Ce test permet d'obtenir une estimation de la durée d'action de l'effet indésirable du candidat médicament sur les différents paramètres évalués²⁸.

Le test d'Irwin mais également le test FOB sont utilisés pour répondre à différentes questions, comme par exemple, la recherche des doses thérapeutiques potentielles, les doses appropriées pour les tests suivants. Ils permettent aussi de définir un index thérapeutique en comparaison aux doses thérapeutiques trouvées. Concernant l'évaluation de la neurotoxicité, le test FOB est le plus utilisé et est réalisé selon les BPL (avec plus d'animaux dans les différents groupes définis et avec, d'une part, des doses qui soient suffisamment faibles pour déterminer la dose sans effet observable (*No Observed Effect Level* NOEL) et d'autre part, des doses qui soient élevées afin de noter des changements neurocomportementaux)²⁷.

Le but est d'établir un profil neurologique global.

3. PRINCIPE ET PROCEDURE

Les résultats du test relèvent d'une évaluation subjective des différents aspects neurocomportementaux de l'animal. Afin de garantir une reproductibilité, le test est réalisé de manière standardisée par différents expérimentateurs.

Les animaux reçoivent le candidat-médicament, en administration unique et sont observés de manière simultanée en comparaison avec un groupe contrôle qui reçoit du véhicule²⁶. Concernant les doses testées, 4 doses différentes sont généralement testées. Dans les études de pharmacologie de sécurité, les doses testées sont d'ordre thérapeutiques et supra-thérapeutiques. L'observation des animaux se fait en plus dans différentes configurations : observation dans la cage de l'animal, la prise en main de l'animal et l'observation en champ libre.

Parmi les points parcourus de manière spécifique dans le test d'Irwin, il y a la sédation, l'excitation, la démarche anormale, les sursauts, les incoordinations motrices, la perte de tonicité musculaire, l'akinésie, les signes de catalepsie (perte transitoire du mouvement volontaire des muscles), la perte de l'équilibre, l'altération de la respiration, les signes d'agressivité et bien d'autres symptômes encore qui sont listés dans le tableau ci-dessous²⁸.

Durant le test, les différentes observations sont scorées selon le degré de sévérité, estimé par l'expérimentateur. De plus, ces observations sont répétées afin d'obtenir une cinétique (exemple à 1h, 2h, 4h, 6h, 24h après traitement). Des symptômes comme les convulsions, la démarche anormale, la démangeaison ou la piloérection sont demandés à être observés en continu après l'administration, sur une fourchette de 15mn²⁶.

Irwin/FOB Behavioral Profile	Date:		Investigator			
Species:	Strain:					
Compound:	Doses:		Route:	Dose Time		
Vehicle:	Dose volume:					
Severity/scoring key: <i>sl</i> = slight; <i>md</i> = moderate; <i>mk</i> = marked; <i>ex</i> = extreme; or +/-						
Time point:	Weight:	Weight:	Weight:	Weight:	Weight:	Weight:
	Volume:	Volume:	Volume:	Volume:	Volume:	Volume:
	Temp:	Temp:	Temp:	Temp:	Temp:	Temp:
	Ctl	A	B	C	D	E
Undisturbed beh	1	2	3	4	5	6
Body position						
Locomotor activity						
Piloerection						
Ptosis						
Exophthalmos						
Unusual behavior						
Writhing						
Respiration						
Tremors						
Twitches						
Convulsions						
Startle						
Comments						
With Handling:						
Reactivity to touch						
Abdominal tone						
Limb tone						
Aggressiveness to handler						
Pupil size						
Visual placement						
Grip strength						
Tail suspension						
Pinnae reflex						
Lacrimation						
Salivation						

Check Sheet Page 2: Time Point: _____ Date: _____

	Ctl	A	B	C	D	E
	1	2	3	4	5	6
Cont. With Handling						
Diarrhea						
Increased urination						
increased defecation						
Vocalization						
In the Open Field						
Ataxia						
Foot splay while walking						
Straub tail						
Increased locomotion						
No exploration						
Tail pinch						
Body temperature						
Comments						

Figure 10. Liste des paramètres étudiés et scorés lors d'un test d'Irwin/ FOB²⁷.

4. APPLICATIONS A L'EVALUATION DU RISQUE DE CRISES EPILEPTOÏDES

Les tests d'Irwin et de FOB permettent d'examiner de nombreux paramètres (du comportement aux fonctions motrices). Les modifications neurocomportementales associées aux « *seizures* » sont remarquées par des comportements anormaux qui peuvent précéder les convulsions (chez les rongeurs) comme des secousses de la tête, des démangeaisons, un toilettage extrême, des contractions musculaires et une perte générale de la locomotion ainsi que de la capacité exploratoire²⁹.

Cependant, ces tests ne sont pas spécifiques dans la détection du risque de crises épileptoïdes, les tests dits « *multiscreening* » ont une faible sensibilité dans la détection de ce risque¹⁴.

Nous avons vu précédemment que les modifications neurocomportementales sont observées sur différents temps qui sont fixés, il peut y avoir des signes de convulsions durant les périodes de non-observations. Il est aussi difficile de détecter des « *seizures* » du comportement général de l'animal et surtout, les résultats de ces tests sont évalués après une seule administration du candidat médicament. Les composés pro-convulsivants se manifestent souvent à doses répétées ; en règle générale, les composés non convulsivants sont plus amenés à provoquer des convulsions après une administration chronique.

5. AVANTAGES ET LIMITES

Ces tests permettent d'évaluer plusieurs domaines neuro-fonctionnels (excitabilité, activité, système sensori-moteur, neuromusculaire, système nerveux autonome et les mouvements anormaux). Même si ces tests sont axés principalement dans l'évaluation neurocomportementale, les effets des candidats médicaments peuvent aussi donner des indications sur d'autres fonctions physiologiques (système respiratoire, motilité intestinale). En ayant testé sur de petits groupes d'animaux et sur une courte durée (généralement, les études de pharmacologie de sécurité sont conduites dans une fourchette de 24h), les tests d'Irwin ou de FOB fournissent des données rapides de sécurité des candidats médicaments et surtout une estimation des intervalles de doses thérapeutiques qui seront investiguées dans les études de toxicologie²⁸. Cependant, ces tests comportent quelques limites ; les résultats obtenus sont d'ordre qualitatifs et basés sur les modifications neurocomportementales qui sont scorées selon l'évaluateur (subjectivité). De plus, l'effet du candidat-médicament sur le SNC des animaux est évalué après une seule administration et dans une fourchette de temps limitée.

Ces tests sont des tests réglementaires et leur conduite est obligatoire dans l'évaluation de la sécurité du SNC. Cependant, des *guidelines* sur les aspects importants et expérimentations de ces tests à effectuer manquent. Il n'y a pas d'harmonisation entre les différents laboratoires qui conduisent les évaluations neurocomportementales selon leurs procédures; des études ont d'ailleurs été menées sur la fiabilité et la reproductibilité intra et inter-laboratoire qui soulignent l'aspect subjectif des différents évaluateurs²⁷.

B. LES DIFFERENTS TESTS D'EVALUATION DU RISQUE DE CRISES EPILEPTOÏDES

1. LISTE NON EXHAUSTIVE RESUMANT LES DIFFERENTS TESTS POUR L'EVALUATION DU RISQUE DE CRISES EPILEPTOÏDES ET DU POTENTIEL CONVULSIVANT

Tests <i>in vitro</i>	Profil pharmacologique	
	Culture de neurones 2D et 3D	
	Electrophysiologie	
Tests <i>in vivo</i>	Tests neuro-comportementaux (décrits précédemment)	Test d'Irwin et FOB
		Zébrafish
	Tests évaluant le potentiel convulsivant	Zébrafish
		Modèles pharmacologiques
		Modèles stimulés par une stimulation électrique
	EEG	
	Etudes précoces <i>in vivo</i> (Pharmacocinétique (PK))	

Table 3. Les différents tests pour évaluer le risque de crises épileptoïdes et du potentiel convulsivant

Lors des crises, l'activité électrique est incontrôlée dans le cerveau, cela se traduit par un désordre électrique qui pourrait conduire à une manifestation clinique ou non. Même si les signes cliniques sont absents, le risque d'apparition de crises reste présent. Les crises peuvent alors être détectables, seulement, par des enregistrements sur l'EEG, car détecter une activité neuronale anormale basée sur des observations du comportement est difficile. Pour faciliter l'identification du risque d'apparition de crises lors des phases précoces du développement d'un médicament, l'évaluation des perturbations de l'activité neuronale en *in vitro* pourrait indiquer ce risque neurobiologique.

2. LES TESTS *IN VITRO*

a. Profil pharmacologique

i. Généralités

La recherche du profil pharmacologique des composés à haut débit permet d'évaluer leurs cibles dans le SNC, afin d'identifier les activités secondaires du composé dites « *off-target* » qui peuvent empêcher le développement des candidats médicaments. Ce profil pharmacologique est conduit dans les études précoces du développement préclinique. Ceci s'inscrit dans les études de pharmacologie comprenant la pharmacologie primaire et la pharmacologie secondaire qui étudient le mécanisme d'action principal des candidats médicaments et leurs mécanismes d'action secondaires respectivement. Ces mécanismes d'action secondaires peuvent amener à des effets indésirables.

Pour rappel, les études de pharmacologie de sécurité consistent à l'évaluation des potentiels effets indésirables, d'ordre pharmacodynamique, d'un candidat médicament sur les fonctions physiologiques de l'organisme aux doses thérapeutiques et aux doses supra-thérapeutiques.

Les interactions *off-target* sont souvent responsables des effets indésirables qui apparaissent lors des études précliniques animales ou lors des études cliniques.

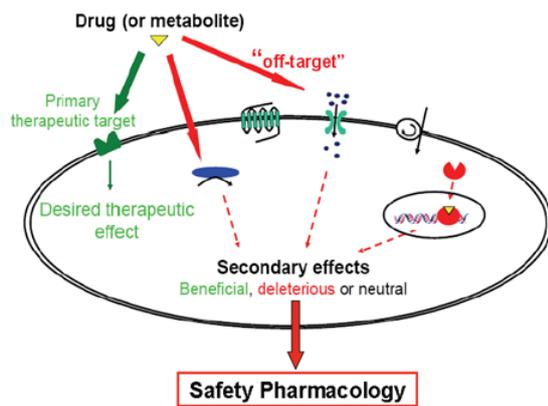


Figure 11. Aperçu de la pharmacologie de sécurité³⁰

ii. But et applications

L'établissement du profil pharmacologique implique de cribler des composés à haut débit contre un panel de cibles potentielles qui sont différentes de la cible thérapeutique, permettant ainsi d'identifier les interactions moléculaires qui peuvent causer les effets indésirables. Ceci aiderait à réduire le taux d'attrition dans le développement pharmaceutique et cela, en favorisant ce type d'étude dans les phases précoces du développement. En effet, il a été estimé qu'environ 75% des effets indésirables des médicaments sont dose-dépendantes et qu'ils pouvaient être prédits lors des études de profil pharmacologique (effets indésirables liés à l'activité pharmacologique, soit de type A)³¹.

Le but d'établir le profil pharmacologique des candidats médicaments est de se concentrer sur la sécurité de ces derniers à un stade précoce du développement, réduisant *in fine* le taux d'attrition des futurs médicaments. L'étude précoce de la sécurité au cours du développement peut aider dans la décision des candidats médicaments, en particulier lors des phases de découverte de molécules, et réduire les problèmes de sécurité rencontrés dans les phases cliniques³¹.

iii. Principe

Dans le passé, ces études étaient réalisées pour les candidats médicaments « *leads* » contre un petit panel de cibles qui étaient liés à la classe thérapeutique du candidat médicament. Grâce au développement du *screening* à haut débit, le panel de cibles a été élargi aux cibles impliquées dans la régulation des systèmes physiologiques vitaux (cardiovasculaire, respiratoire et SNC). Le choix des cibles moléculaires à évaluer est basé sur plusieurs critères de sélection tels leur expression dans l'organisme, les effets biologiques suivant une pharmaco-modulation et surtout

la mise en évidence d'un effet indésirable en clinique (généralement post-AMM) d'une cible moléculaire spécifique.

Les études de liaison aux cibles moléculaires utilisent des préparations purifiées de protéines recombinantes ou de tissus qui expriment la cible moléculaire étudiée, en présence d'un ligand marqué avec une haute affinité pour cette cible. Le marquage se fait par couplage à une sonde fluorescente ou à un radioisotope. Les candidats médicaments sont testés pour leur capacité ou non de déplacer la liaison du ligand marqué à son récepteur (expérience de compétition). Les études de liaison peuvent être suivies d'études fonctionnelles. En suivant la première méthodologie, les résultats obtenus sont plus rapides, car les études fonctionnelles ne sont réalisées que sur les candidats médicaments « *hits* ». Ces dernières permettent de mesurer l'activité du ligand (soit d'identifier si le candidat médicament présenterait une activité agoniste ou antagoniste vis-à-vis de la cible étudiée)³¹.

N.B : Les études de liaison initiales devraient tester une fourchette de concentrations différentes afin d'estimer la concentration dite EC50 qui correspond à la concentration à laquelle le candidat médicament est efficace à 50%. En suivant cette méthodologie, les résultats fournis sont plus fiables que si les études de liaison étaient effectuées à partir d'une seule concentration (test effectué en duplicata).

De plus, si le profil pharmacologique est demandé par les autorités réglementaires, il est recommandé d'investiguer la relation concentration-réponse et de fournir des données quantitatives (Kd, IC50 ou EC50) qui puissent permettre de mieux interpréter les résultats³¹.

iv. Application à l'évaluation du risque de crises épileptoïdes

Dans le SNC, que ce soit sur les cellules neuronales ou non, se trouvent différentes cibles potentielles dont les canaux ioniques voltage et ligand-dépendants, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des enzymes et transporteurs. Des composés peuvent se lier sur ces différentes cibles et avoir des effets sur le SNC, dont l'induction de crises épileptoïdes¹⁴.

Dans cette revue¹⁴, 53 cibles ont été listées et classées comme susceptibles de provoquer des crises épileptoïdes¹⁴. La potentialité d'induire des crises par le biais de ces cibles peuvent ainsi être étudiées lors des études *in vivo*.

Dans le tableau, les cibles secondaires ont été classées selon 4 critères qui pourraient être liés à l'induction de crises :

- Pharmacologique : L'induction de crises *in vivo* est relatée à la sélectivité des molécules pour des cibles particulières.
- Génétique : Les mutations géniques codant pour la cible moléculaire, sont-elles associées aux crises chez l'Homme ?
- Antiépileptique : La cible est-elle le site d'action des antiépileptiques ? Les antiépileptiques exercent leur effet thérapeutique en modulant pharmacologiquement un certain nombre de cibles moléculaires. Il faut prendre en compte que la modulation pharmacologique d'une même cible peut induire des crises.
- BioprintTM : C'est une base de données qui a permis d'obtenir le profil de liaison de 266 composés testés dans des études antérieures. Ces composés étaient considérés actifs, dans un test donné, si leur activité inhibitrice était supérieure ou égale à 50%. Les données de liaison ont ensuite été analysées pour déterminer quelles liaisons étaient significativement retrouvées dans les composés responsables de crises.

Un « + » parmi un de ces 4 critères était considéré comme candidat médicament potentiellement impliqué dans l'apparition de crises.

L'absence de symbole représenté dans le tableau indique qu'il n'y a pas de lien dans l'apparition de crises. L'analyse de cette revue ne fournit pas de résultats définitifs dans le risque d'induire des crises. Des études complémentaires sont à apporter en effectuant un test des composés potentiellement positifs sur ces récepteurs, dans des modèles pathologiques par exemple.

Pharmacological targets with a positive association to drug-induced seizure

	Link to seizure			
	Pharmacological	Genetic	Antiepileptic drug	Bioprint™
G-protein-coupled receptors				
5-HT _{1A-B}	+			+
5-HT _{2A}				+
5-HT _{2C}	+			+
5-HT ₆				+
5-HT ₇	+			+
Adrenergic $\alpha_{1A, 2A-C}$				+
Adrenergic β_{1-3}				+
Cannabinoid CB ₁	+			+
Dopamine D ₁	+			+
Dopamine D _{2, 3, 4,4}				+
Growth hormone secretagogue				+
Histamine H _{1,2}				+
Melanocortin M ₁				+
Muscarinic acetylcholine M ₁	+			+
Muscarinic acetylcholine M ₂₋₅				+
Opioid δ	+			
Opioid κ				+
Sigma Nonselective				+
Urotensin UT ₁				+
Ligand-gated ion channels				
5-HT ₃				+
AMPA	+		+	
GABA _A agonist site	+	+		
GABA _A Flunitrazepam site	+	+	+	
Glycine, strychnine site	+			
Kainate	+		+	+
Nicotinic acetylcholine	+	+		
NMDA, agonist site	+		+	
NMDA, glycine site	+		+	N/A
NMDA, phencyclidine site	+		+	N/A
Voltage-gated ion channels				
K _{ATP} potassium channel	+	+		+
Sodium Channel Site 2	+	+	+	+
L-type calcium channel diltiazem site				+
L-type calcium channel verapamil site				+
K _A potassium channel	+	+		
KNCQ2/3 potassium channel	+	+	+	N/A
Transporters				
5-HT transporter	+			+
Noradrenaline transporter	+			+
Dopamine Transporter				+
Enzymes				
Acetylcholinesterase	+			

5-HT: 5-hydroxytryptamine. AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate. GABA: γ -aminobutyric acid. NMDA: N-methyl-D-aspartate. N/A: Data not included in Bioprint™ database.

Table 4. Cibles pharmacologiques associés à un risque d'induction de crises¹⁴

Les résultats obtenus avec l'étude de profil pharmacologique ne sont pas catégoriques dans l'évaluation du risque de crises épileptoïdes mais fournissent des données utiles pour la suite des études précliniques.

v. Avantages et limites

Malgré de nombreux avantages, des industriels diminuent le panel de cibles à évaluer, en raison de contraintes budgétaires. Ils se concentrent seulement sur les cibles qui présentent un fort taux de réussite et un fort impact (par exemple le canal hERG et les récepteurs muscariniques M1)³¹. Pourtant, si l'étude était étendue à plus de cibles, le profil pharmacologique des candidats médicaments serait plus appréhendés avant les études cliniques chez l'Homme.

Cela est favorisé par le fait qu'un seul test de pharmacologie soit requis par les autorités réglementaires, il s'agit du test *in vitro* Ikr qui évalue les effets du courant ionique du canal Ikr issu du canal potassique voltage-dépendant hERG. L'inhibition du courant Ikr peut provoquer des torsades de pointes et une prolongation de l'intervalle QT qui est un effet indésirable grave. Cet effet est d'ailleurs investigué dans les études de pharmacologie de sécurité du système cardiovasculaire, décrit dans l'ICH S7B³². De plus, des études de liaison sont aussi réalisées dans l'évaluation de la pharmaco-dépendance des candidats-médicaments (autre partie des études de pharmacologie de sécurité du SNC). Les autorités réglementaires ne définissent pas quelles cibles moléculaires étudier précisément et n'indiquent pas non plus la place du profil pharmacologique *in vitro* dans la phase de développement.

Les laboratoires pharmaceutiques réalisent généralement cette étude dans les phases précoces du *drug discovery* dans le but de réduire le taux d'attrition et d'avoir une meilleure prédiction des effets indésirables lors des phases tardives du développement. Les bénéfices qui ont été détaillés tout au long de cette partie sont nombreux.

b. Culture de neurones

i. Généralités

Il y a un besoin réel dans le développement de modèles *in vitro* qui soient prédictifs des effets neurotoxiques des candidats médicaments. La neurotoxicité constitue une des causes majeures dans l'échec des candidats-médicaments, celle-ci survient souvent à des phases tardives du développement. D'autres modèles d'évaluation de la neurotoxicité ont été développés comme les cultures de neurones qui permettent d'étudier l'activité électrique des neurones, et plus précisément les oscillations calciques. Les oscillations calciques résultent de l'influx de calcium extracellulaire dans le neurone post-synaptique à travers les canaux voltage-dépendants représentant ainsi les niveaux de calcium intracellulaires qui accompagnent la dépolarisation neuronale (excitabilité neuronale). Ces oscillations calciques sont observables lorsque plusieurs neurones dépolarisent de manière simultanée.

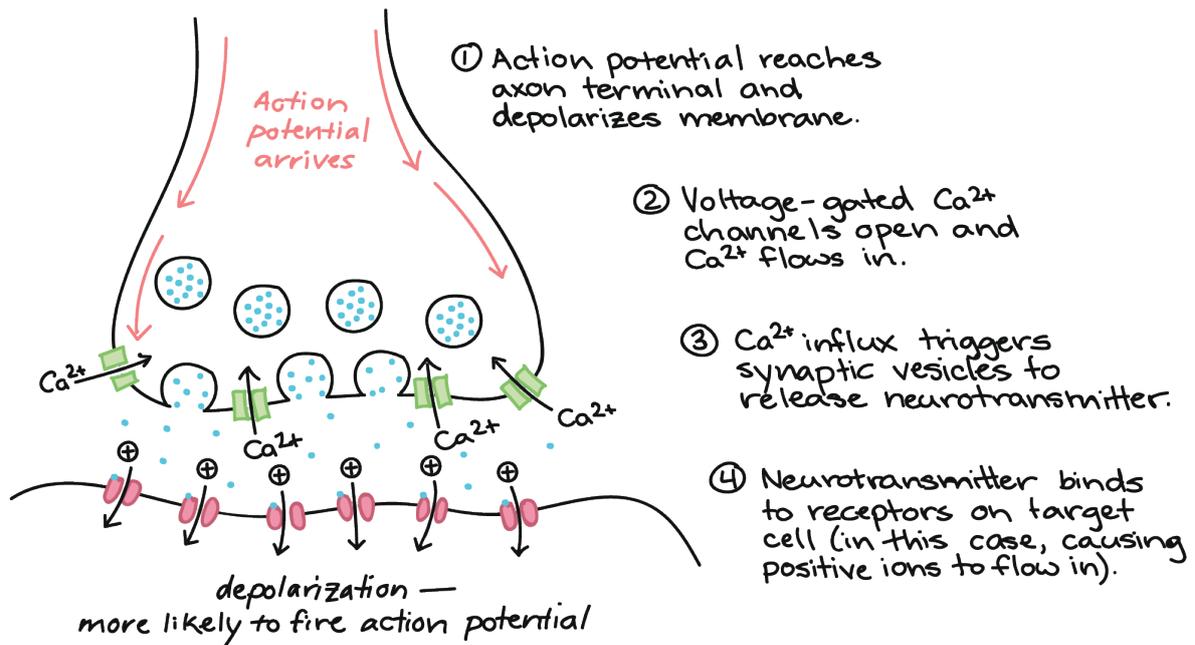
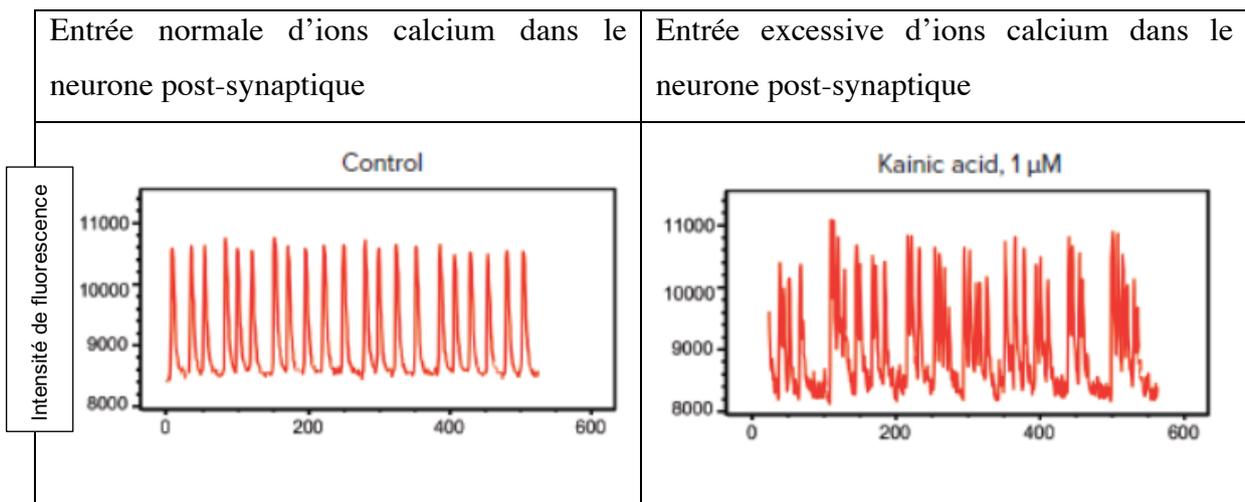


Figure 12. Activité calcique neuronale³³



Le suivi des oscillations calciques se fait grâce à des sondes calciques, celles-ci peuvent fluctuer suite à l'administration d'un candidat médicament qui aurait une action sur le SNC³⁴. Les fluctuations des oscillations calciques sont étudiées car elles reflètent bien les effets des candidats médicaments sur le réseau neuronal³⁵. Elles sont utiles dans l'évaluation de la neurotoxicité (dont les effets épileptoïdes).

Généralement, les neurones d'hippocampe ou du cortex sont exploités car ils sont à l'origine de décharges massives et synchrones qui favorisent l'apparition de crises¹⁵.

ii. But et applications

Les cultures de neurones d'hippocampe et de cortex possèdent de nombreuses applications dans le développement préclinique :

- L'évaluation de la neurotoxicité dont le risque de crises épileptoïdes ;
- Compréhension de la communication neurones – cellules gliales ;
- Recherche de potentielles molécules antiépileptiques (avec la recherche de nouvelles voies moléculaires, de nouveaux modes d'action etc...)

iii. Procédures et application au risque de crises épileptoïdes

Culture de neurones en 2D

• **Méthode :**

Les tests d'oscillations calciques sont basés sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe et/ou de cortex,ensemencés dans des plaques 96 puits. Les neurones d'hippocampe et/ou de cortex sont prélevés à partir de souris ou rats post-natales. L'utilisation d'embryons a aussi été décrite mais l'avantage d'utiliser des souris ou rats post-natales permet de réduire le sacrifice des animaux (la mère et les souris non utilisées, issues d'une même portée peuvent être utilisées pour d'autres études)³⁶.

Une fois les structures d'intérêt prélevées, la dissociation de celles-ci se fait avec de la trypsine, une enzyme qui permet la dissociation enzymatique. L'activité de la trypsine est annulée suite à l'ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal. Après cette étape d'inactivation, les structures contenues dans un tube sont centrifugées puis resuspendues dans du milieu de culture. Les cellules obtenues sont ensuiteensemencées à 50 000c/puits, dans une plaque 96 puits³⁴.

• **Analyse des oscillations calciques :**

Après 14 jours de culture, les neurones arrivent à maturité et sont incubés avec un milieu de chargement, à 37°C pendant une heure. Ce milieu est composé de milieu HBSS, de probenicid, de powerload et de Fluo-4, acétométhylester (Fluo-4, acétoxyméthylester (AM)).

Powerload	Tensioactif non ionique qui aide à disperser les groupements AM
Probenicid	Inhibiteur de transporteurs anioniques OAT

Fluo-4, AM	Le fluo-4 est une sonde calcique fluorescente synthétique composée d'un chélateur spécifique de l'ion calcium Ca ²⁺ conjugué à un fluorophore. Cette sonde est utilisée pour détecter les PAs individuels de chaque neurone. Le chargement en sonde calcique, perméable aux membranes, a l'avantage de pouvoir enregistrer l'activité de centaines de neurones. Cette perméabilité est permise grâce au groupement AM et permet de faciliter le chargement des cellules en Fluo-4.
------------	---

Table 5. Propriétés des composants du milieu de chargement³⁷

Après l'incubation des neurones avec le milieu de chargement, les neurones sont exploités pour étudier l'effet des candidats médicaments sur les oscillations calciques. Les variations d'oscillations calciques surviennent en conséquence à des composés qui modulent l'activité des canaux voltages et ligands-dépendants (NMDA, AMPA, Kainate). La lecture des oscillations calciques se fait grâce à un appareil qui est capable de suivre la fluorescence émise par le Fluo-4 (lié au calcium intracellulaire). La durée de lecture est fixée par l'opérateur. L'opérateur observe les oscillations calciques en conditions basales puis après l'injection du candidat médicament (préalablement dissous dans du HBSS ou DMSO, aux concentrations étudiées). Les véhicules correspondants (soient HBSS et DMSO à une concentration finale de 0,1% généralement) sont aussi injectés afin d'évaluer l'effet injection sur les oscillations calciques.

Le risque d'induire des crises épileptoïdes d'un candidat médicament est évalué qualitativement selon la figure ci-dessous, en se basant sur les variations des oscillations calciques suite à l'injection du candidat médicament (ou véhicule) par rapport aux oscillations calciques en conditions basales.

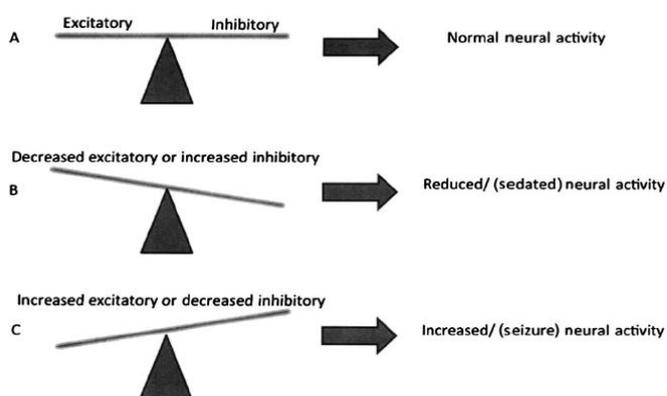


Figure 13. Types de réponses calciques

A : Pas de variations de la fréquence et/ou de l'amplitude
B : Diminution de la fréquence et/ou de l'amplitude = réponse calcique bloquante
C : Augmentation de la fréquence et/ou de l'amplitude = réponse calcique excessive (risque d'apparition de crises)

Afin de mieux interpréter les signaux calciques, soit quantitativement, il est nécessaire de réaliser des analyses statistiques en évaluant l'effet des différentes concentrations testées des candidats médicaments sur la fréquence et l'amplitude des oscillations calciques. La fréquence représente le nombre d'oscillations calciques et l'amplitude représente la hauteur des oscillations, correspondant au nombre de neurones qui participent à la synchronisation³⁸.

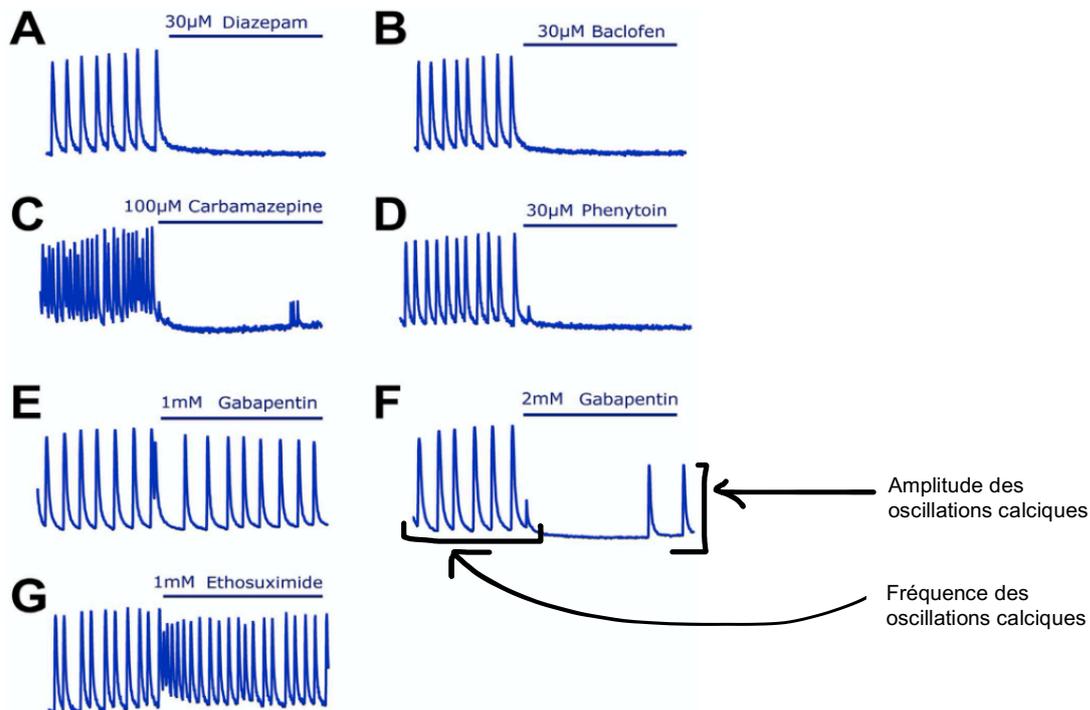


Figure 14. Variation des oscillations calciques suite à l'injection d'antiépileptiques
Ces antiépileptiques agissent en augmentant l'activité du récepteur GABA.

Prérequis :

Ces modèles évaluant l'activité épileptiforme des candidats médicaments, il y a besoin de faciliter les oscillations calciques en utilisant des solutions avec une faible concentration d'ions Mg^{2+} .

Dans la littérature, les oscillations calciques spontanées intracellulaires sont plutôt observées lorsque les cultures primaires de cortex ou d'hippocampe sont cultivées à une densité haute. Une densité haute est considérée dès que 50 000 cellules par puits sontensemencées. Lorsque les neurones de cortex ou d'hippocampe sontensemencés à 20 000 cellules par puits ou moins, les oscillations calciques spontanées n'apparaissent pas³⁴. La densité de 50 000 cellules/puits a donc paru être optimale pour observer des oscillations calciques spontanées et stables lorsqu'elles sont exposées à 0,1mM de $MgCl_2$. Le magnésium joue un rôle de blocage

pharmacologique sur le récepteur NMDA, diminuant l'afflux de calcium dans le canal calcique. En utilisant une solution appauvrie en magnésium, cela permet le passage d'ions calcium dans le récepteur NMDA, facilitant ainsi la dépolarisation du récepteur ainsi que l'apparition d'oscillations calciques spontanées et synchrones. Des études ont évalué les oscillations calciques des neurones exposés à de fortes concentrations en ions Mg^{2+} et ont montré qu'il y avait peu, voire pas d'oscillations calciques, sur une durée d'enregistrement de dix minutes³⁴. Dans ces modèles de culture de neurones, des molécules de référence sont testées en parallèle aux candidats médicaments. Souvent, la 4-aminopyridine est utilisée comme référence positive, il s'agit d'un médicament indiqué dans le traitement de la sclérose en plaque pour améliorer la mobilité des patients. En inhibant les canaux K^+ dans le SNC, cette molécule facilite la dépolarisation et le transfert du calcium dans les neurones, permettant ainsi d'améliorer la communication neuronale chez ces patients. Par ailleurs, dans le cadre des essais cliniques avant sa mise sur le marché, la 4-aminopyridine a montré qu'elle pouvait induire des crises convulsives. En raison de son activité proconvulsivante, elle est utilisée dans les études *in vitro* et *in vivo* comme produit de référence³⁹.

- **Avantages et limites :**

La capacité du modèle de culture de neurones en 2D à identifier et caractériser des réponses excitatrices, bloquantes voire neutres, à des concentrations données, représente une étape stratégique et importante dans l'évaluation *in vitro* de la sécurité sur le SNC et permettra ainsi le développement de médicaments plus sûrs. Pour apporter plus de dimensions dans la prédictibilité, il faudra continuer à tester d'autres composés et voir si les effets indésirables reportés en clinique sont observés de même sur le modèle *in vitro*. Pour aller plus loin, une alternative à l'utilisation de cellules neuro-gliales de souris serait de réaliser le modèle à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSCs en anglais) ou des organoïdes (culture de neurones en 3D), afin de développer ce modèle et avoir davantage de prédictibilité vers l'humain dans l'évaluation du risque d'induction de crises.

Culture de neurones en 3D

La neurotoxicité étant un effet indésirable majeur qui survient tardivement dans le développement du médicament, des laboratoires ont développé des modèles plus complexes, plus physiologiques apportant plus de prédictibilité dans le *screening* des candidats médicaments ou des médicaments neurotoxiques. Les cultures de neurones en 3D sont des

modèles *in vitro*, où comme les cultures de neurones en 2D, il est possible de détecter des oscillations calciques spontanées et d'utiliser ces modèles dans la détection du risque de crises épileptoïdes des candidats médicaments. Dans cette étude³⁵, un modèle 3D est proposé à partir de cellules souches pluripotentes induites de neurones de cortex ainsi que d'astrocytes humains afin d'évaluer la neurotoxicité d'une dizaine d'agents neuroactifs et 22 substances dont la neurotoxicité a été avérée.

- **Méthodes :**

Les laboratoires ont développé des cultures de neurones en 3D prêtes à être utilisées dans un format de 384 puits. Dans chaque puits se trouve un sphéroïde d'IPSCs de neurones corticaux qui ont été générés à partir de cellules progénitrices neurales d'un seul donneur humain⁴⁰.

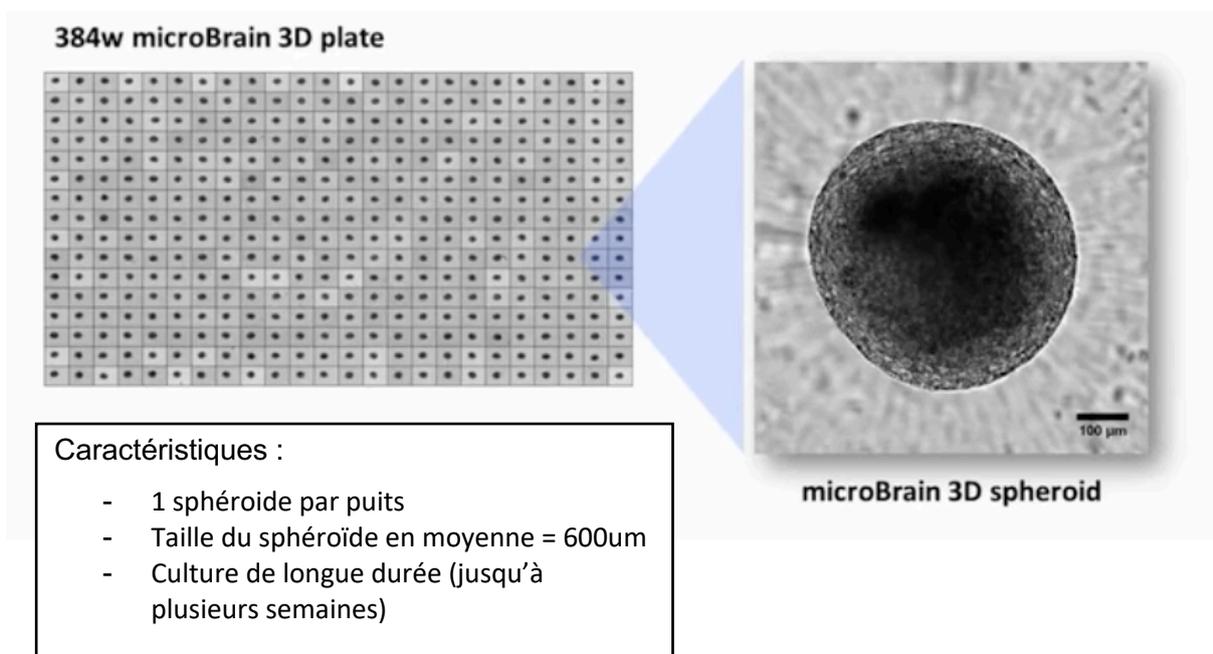


Figure 15. Image d'un sphéroïde (en contraste de phase) de la plateforme microBrain 3D
Les sphéroïdes de neurones sont exposés à des concentrations différentes de substances neuroactives et neurotoxiques pendant 24h ou 72h. Un contrôle véhicule a aussi été testé (DMSO à 0,15%).

- **Analyse des oscillations calciques :**

Pour analyser les effets de ces substances sur l'activité calcique, une sonde calcique qui se lie au calcium intracellulaire est rajoutée dans chaque puits pendant 2h, après l'étape d'exposition aux substances. L'intensité de la fluorescence change selon la concentration en calcium et se lit sur un appareil comme le FLIPR® TETRA qui permet de suivre la cinétique calcique.

L'analyse des oscillations calciques se déroule de la même manière que pour les cultures de neurones en 2D (analyse qualitative : aspect des oscillations calciques et analyse quantitative : analyse statistique). L'analyse quantitative des oscillations calciques s'est basée sur 6 paramètres que sont la fréquence des pics, l'amplitude maximale moyenne, la largeur du pic moyen, l'espace moyen entre les pics, le sommet des pics et les phases de repolarisation ; ce qui permet de caractériser et quantifier les réponses physiologiques des sphéroïdes de neurones aux substances neuroactives et neurotoxiques.

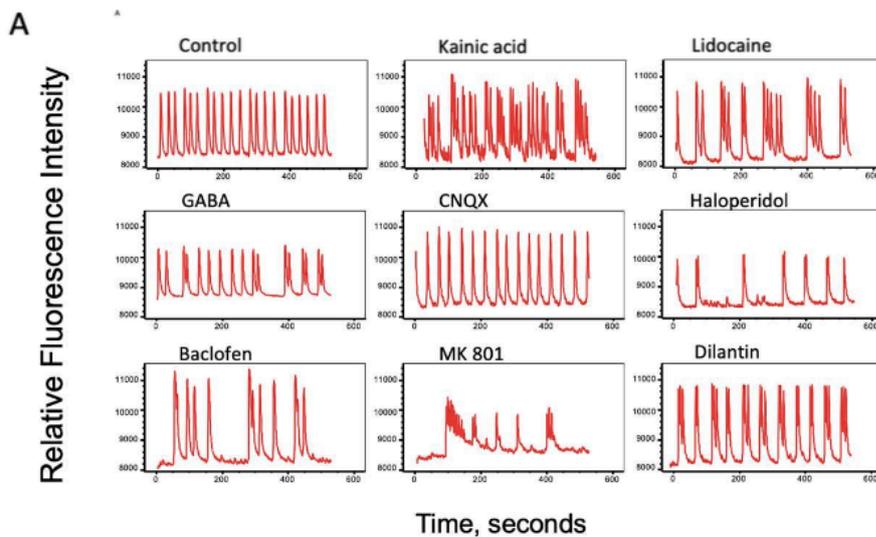


Figure 16. Exemple des oscillations calciques des substances testées sur les sphéroïdes de neurones

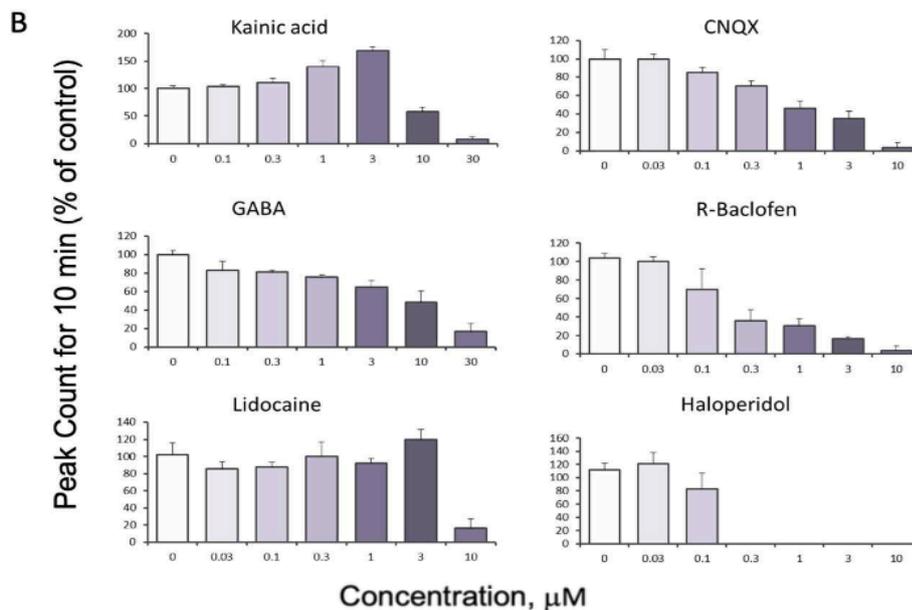


Figure 17. Courbes concentrations-réponses de la fréquence des pics des mêmes substances testées sur la figure précédente

L'exposition des sphéroïdes au kainate, agoniste des récepteurs kainate montre un effet pharmacologique attendu (par son mécanisme d'action) qui indique une réponse excitatrice du système glutamatergique. Dans la figure ci-dessous, l'acide kainique montre un effet inhibiteur aux concentrations supérieures à 3 μ M. Cet effet inhibiteur pourrait être dû à une activation excessive ou à une désensibilisation des récepteurs glutamatergiques. Le traitement avec le CNQX, un antagoniste des récepteurs AMPA/Kainate montre une diminution concentration-dépendante de la fréquence des pics. Comme attendu, le GABA et le R-baclofène étant des agonistes des récepteurs GABA montrent une diminution concentration-dépendante de la fréquence des pics des oscillations calciques également. La lidocaïne et l'halopéridol ont présenté un effet sur les oscillations calciques conduisant à une inhibition des oscillations calciques.

Ces résultats montrent que les oscillations calciques des cultures d'IPSCs de neurones en 3D ont été sensibles aux substances testées, ce qui montre un lien entre les oscillations calciques spontanées observées et l'activité neuronale.

Dans cette étude, d'autres paramètres que les oscillations calciques ont été évalués pour tester le potentiel neurotoxique tels que le test de croissance des neurites (l'inhibition des neurites observé dans les études *in vitro* est reconnu comme un effet neurotoxique chez les humains et chez les rongeurs)³⁵. Afin de différencier les effets neurotoxiques des effets toxiques généraux, la viabilité cellulaire a été effectuée par évaluation de l'intégrité des mitochondries ; l'intégrité non préservée des mitochondries signifie un effet cytotoxique). Toutefois, les fluctuations des oscillations calciques sont plus associées aux effets neurotoxiques que la viabilité cellulaire, un effet non spécifique de la neurotoxicité puisqu'il survient plus tardivement. La dérégulation du signal calcique a d'ailleurs été reporté comme l'un des premiers éléments anormaux qui survient dans les pathologies neurodégénératives. Le calcium est un élément important dans le cerveau, il assure les fonctions intracellulaires, l'activité neuronale (par sa participation dans la génération de PAs) et assure la communication cellulaire (neurones-astrocytes).

- **Avantages et limites :**

Les modèles de culture 3D sont très intéressants car ils constituent des modèles pertinents dans le domaine de la recherche, allant de la compréhension de la physiopathologie du tissu à l'évaluation de molécules. Les modèles de culture 3D récapitulent bien les tissus en respectant leur architecture, l'organisation cellulaire, les interactions entre cellules et cellules-matrice extracellulaire. Par rapport aux modèles de culture 2D, il a été reporté que les modèles 3D

présentent un phénotype neuronal plus mature que celui des modèles 2D, prenant en compte l'activité neuronale, les réponses pharmacologiques et le profil d'expression des gènes spécifiques au phénotype mature.

Les modèles cellulaires 3D, tout comme les modèles 2D manquent de relevance métabolique, ils ne peuvent pas permettre de détecter tous les effets neurotoxiques qui seraient possible d'observer sur des modèles *in vivo* tels que les effets sur la myéline des axones, les effets sur la neuroglie ou encore les mécanismes de transmission synaptique des neurotransmetteurs. Néanmoins, les modèles de culture 3D ont démontré leur potentiel dans l'évaluation de la sécurité des candidats médicaments du fait de leur capacité à *screener* à haut débit, à être produit de façon reproductible mais aussi à être prédictif³⁵.

Des laboratoires ont étudié les oscillations calciques dans les neurones de cortex et d'hippocampe ont observé une activité calcique associable à des bouffées de PAs, soit à une activité épileptiforme. Cette activité épileptiforme a aussi été observée sur des tranches d'hippocampe, où chaque oscillation calcique correspond à un évènement ictal qui est dû à une activité synchrone du réseau de neurones³⁴.

c. Electrophysiologie sur tranche de cerveau

i. Généralités

L'électrophysiologie sur tranches de cerveau est une méthode *in vitro* qui est couramment utilisée dans l'évaluation de la sécurité du SNC au cours des études précliniques de sécurité mais aussi dans la phase précoce des études de découverte de potentielles molécules. L'un des points forts de l'électrophysiologie sur tranche de cerveau est la conservation de l'intégrité structurale des réseaux neuronaux et l'organisation temporelle qui est « *in vivo-like* »⁴¹.

Comme les cultures de neurones, une des régions étudiées est l'hippocampe qui est une région du cerveau fortement associée aux crises partielles ; cette partie du cerveau est constituée de 90% de neurones excitateurs glutamatergiques (NMDA, AMPA et Kainate) et de 10% de neurones inhibiteurs gabaergiques (GABA A). Par ailleurs, le foyer situé dans le lobe temporal, au niveau de l'hippocampe est propice aux épilepsies partielles et focales¹⁵.

ii. But et applications

Le but est d'évaluer le potentiel des candidats médicaments à provoquer des crises épileptoïdes en passant par la mesure de l'activité électrique sur une tranche de cerveau d'hippocampe de rats ou de souris. L'activité électrique anormale qui est due aux crises épileptoïdes peuvent être induites spontanément et enregistrées sur une tranche de cerveau grâce aux techniques d'électrophysiologie. Celle-ci est mesurée à travers le signal calcique qui reflète l'activité des réseaux neuronaux, comme dans les cultures de neurones.

Les études d'électrophysiologie sur tranches de cerveau ne rentrent pas dans la réglementation mais sont réalisées par les laboratoires pharmaceutiques pour adresser la neurotoxicité et en particulier l'activité « *seizure-like* » dans leurs études de sécurité.

iii. Principe

Les tranches d'hippocampe sont largement utilisées pour étudier comment les candidats médicaments influencent l'excitabilité neuronale. Il y a deux grandes étapes dans l'établissement de cette manipulation, la préparation des tranches d'hippocampes, le plus souvent à partir de rats ou de souris euthanasiés puis l'électrophysiologie.

Préparation des tranches d'hippocampe

Les animaux sont anesthésiés puis euthanasiés. Le cerveau est prélevé suite à un geste chirurgical et est immédiatement immergé dans une solution physiologique comme la solution artificielle de liquide cérébro-spinal froide qui permet de conserver la tranche tout le long de la manipulation. Les tranches de cerveau sont obtenues grâce à un appareil, le vibratome qui découpe nettement les tranches. Les tranches sont d'une épaisseur de 300-500 μM et sont maintenues dans la solution physiologique. En moyenne, à partir d'un cerveau, 6 à 12 tranches sont obtenues.

Avant d'enregistrer l'activité électrique des tranches par électrophysiologie, celles-ci sont maintenues dans la solution physiologique à température ambiante, pendant une heure au minimum.

Electrophysiologie

L'électrophysiologie est une technique d'enregistrement de l'activité électrique extracellulaire (correspondant au PPSE) sur une tranche de cerveau. La mesure se fait via des électrodes dites « stimulatrices » qui sont placées dans des régions spécifiques de la tranche de cerveau (CA2 ou CA3 dans le stratum radiatum et dans la voie collatérale de Schaffer). Une électrode qui permet l'enregistrement est placée dans la région CA1. Les électrodes « stimulatrices » sont stimulées par des courants de 0,03ms à 30s d'intervalles. Tout le long de l'enregistrement, les tranches sont placées dans un bain à 33-37°C et sont perfusées avec la solution artificielle de liquide cérébro-spinal à un débit de 1-3ml/min.

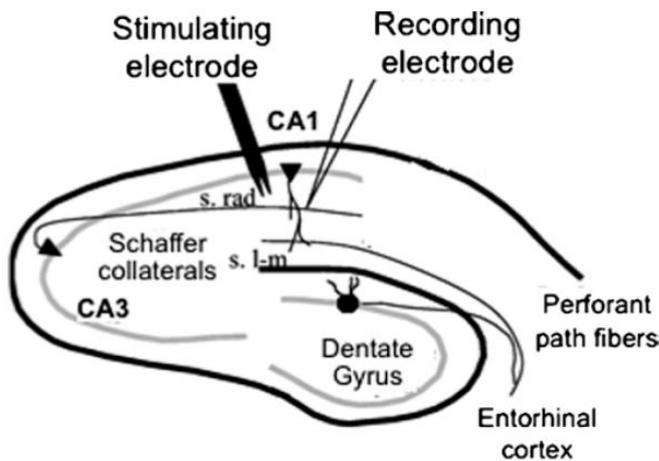
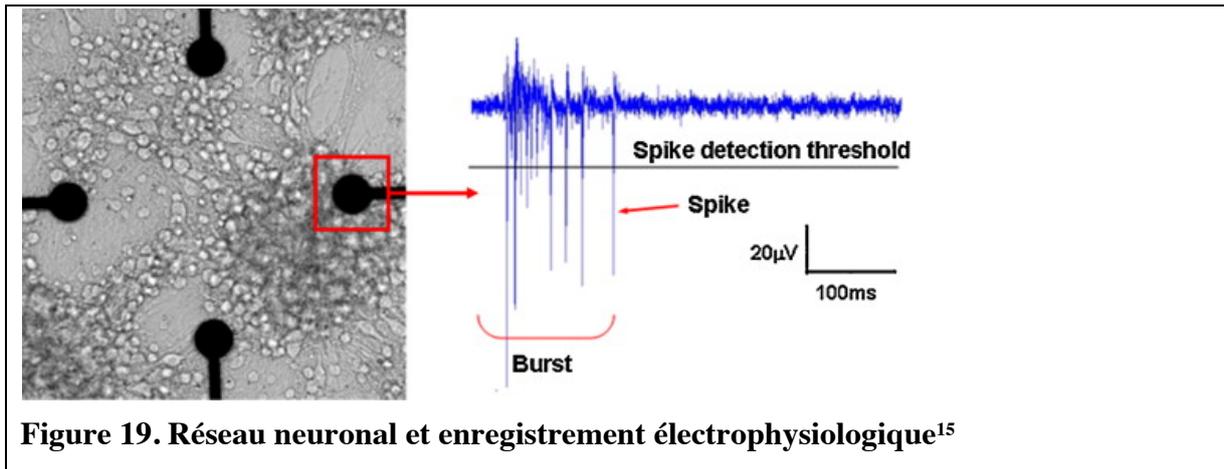


Figure 18. Enregistrement du PPSE de la région CA1 de l'hippocampe⁴²

Pour chacune des tranches, la relation stimulation et concentration-réponse est déterminée. Les tranches sont stimulées jusqu'à ce qu'un pic de population maximale soit observé (ou *population spikes* (PS)). Après le PS observé, l'enregistrement se poursuit jusqu'à stabilité du signal (10mn après le PS).

Comme pour les cultures de neurones, l'interprétation des résultats est aussi basée sur la comparaison à des molécules de référence. Ces molécules de références ont été déterminées en clinique comme convulsivantes (PTZ, diazépam ou 4-aminopyridine).

Elle se fait de même, sur le nombre de décharges neuronales (soit la fréquence), correspondant aux « *bursts* » et à l'amplitude des pics. Les « *bursts* » sont définis par des neurones qui émettent au moins 3 pics (PAs-like) à des intervalles de moins de 8ms⁴³.



iv. Avantages et limites

Les tranches de cerveau constituent un modèle *in vitro* intéressant car l'architecture neuronale y est respectée (intégrité de la structure des microcircuits neuronaux). L'électrophysiologie sur tranches de d'hippocampe de rat a d'ailleurs montré une concordance des résultats avec ceux observés en clinique des médicaments dont un effet proconvulsivant était connu. Sur 19 composés de référence testés (effet proconvulsivant connu), le modèle a montré un taux de prédictibilité de 89%. Il existe cependant des limites.

La tranche de cerveau peut présenter des dommages liés à la coupe, la durée de vie de la tranche est réduite à cause d'un manque d'oxygène et de glucose vis-à-vis des neurones et des contaminations peuvent s'y développer. La durée de manipulation de la tranche de cerveau est ainsi limitée à une fourchette de 6-12h⁴⁴. De plus, l'électrophysiologie est une technique qui n'utilise qu'une seule électrode, par conséquent qui ne donne pas d'information complète sur l'activité neuronale de la tranche. Il existe aussi les tests dits « *multi-electrode arrays* » (MEA) qui peuvent mesurer l'activité électrique de la tranche entière de cerveau, ce qui permet de mieux localiser le foyer épileptique. L'enregistrement avec une électrode seule était dépendant de la région d'implantation de celle-ci¹⁴.

Pour résumer, les résultats issus de ce modèle, mais aussi des autres modèles *in vitro* sont d'ordre complémentaires et ne peuvent pas se substituer aux études *in vivo*⁴¹.

3. LES TESTS *IN VIVO*

a. Tests neuro-comportementaux

i. Test d'irwin et test FOB

Cf partie IV.A.

ii. Zébrafish

Le modèle Zébrafish (nom : *Danio Rerio* de la famille des Cyprinidés) est un modèle animal qui permet l'évaluation de la sécurité neurologique des candidats médicaments. Les larves de Zébrafish présentent des similarités anatomiques et une homologie génétique avec celle des souris ainsi que de l'Homme⁴⁵.



Figure 20. Stades de développement des larves Zébrafish⁴⁶

L'exposition des larves Zébrafish (à 7 jours de la post-fertilisation) au PTZ induit une activité comportementale anormale, de manière dose-dépendante. Le PTZ est un antagoniste non compétitif du récepteur GABA-A (récepteur du GABA qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC) ; c'est un agent stimulant qui provoque des convulsions cloniques, puis toniques pouvant se généraliser. Le PTZ diminue les inhibitions présynaptiques et stimule les centres vasomoteurs et respiratoires⁴⁶.

L'exposition des larves au PTZ induit une augmentation de la vitesse de nage, des déplacements en cercle très rapides suivis par une perte de la posture à très fortes doses. L'activité locomotrice est ainsi mesurée par une analyse vidéo, des déplacements à très forte vitesse reflètent un effet convulsivant. Ces observations suggèrent un effet convulsivant pouvant être classifié selon le tableau de score décrit ci-dessous.

SCORE	Behavior phenotype
0	Short swim mainly in the bottom of the tank.
1	Increased swimming activity and high frequency of opercular movement.
2	Burst swimming, left and right movements, and erratic movements.
3	Circular movements.
4	Clonic seizure-like behavior (abnormal whole-body rhythmic muscular contraction).
5	Fall to the bottom of the tank, tonic seizure-like behavior (sinking to the bottom of the tank, loss of body posture, and principally by rigid extension of the body).
6	Death.

Figure 21. Score comportemental du modèle zébrafish en présence de PTZ dans le milieu⁴⁵

Ces observations comportementales peuvent être complétées par des enregistrements électrophysiologiques qui montrent des décharges assimilées à des évènements ictaux. Les décharges anormales sont caractéristiques des crises convulsives et suivent le schéma ci-dessous, soit une activité inter-ictale de fréquence forte interrompue par des pics de grande amplitude et des pics multiples dits « ictal-like »⁴⁷. Le terme *ictus* réfère aux crises épileptoïdes qui sont des anomalies électriques cérébrales.

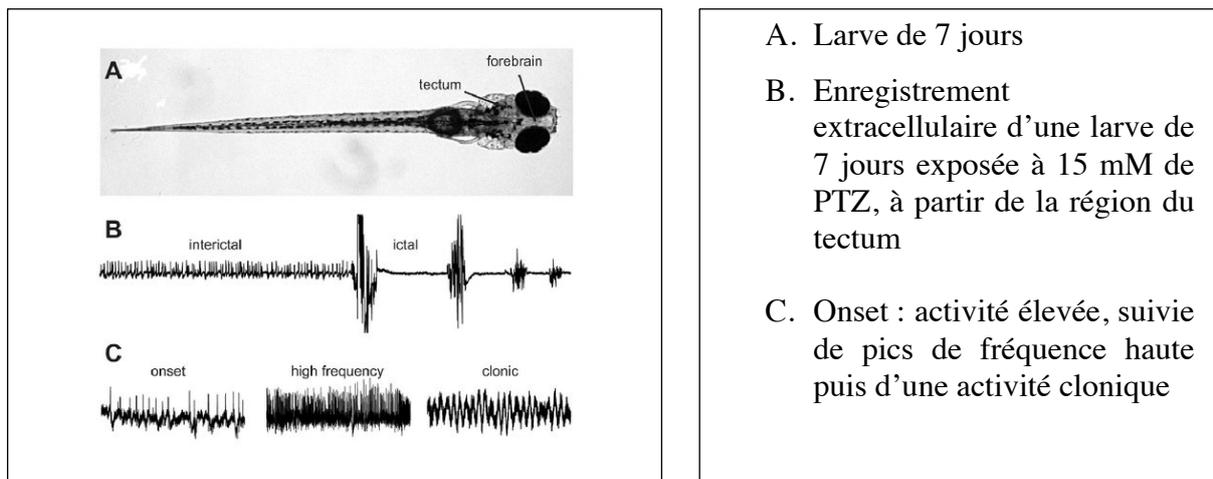


Figure 22. Activité électrique d'une crise enregistrée dans une larve Zébrafish⁴⁷

Les données comportementales et électrophysiologiques montrent que les crises induites par le PTZ, dans les larves Zébrafish, reproduisent plusieurs aspects des crises observées chez les mammifères⁴⁵. Ce modèle est prédictif, peu coûteux et rapide (*screening*), complémentaire et/ou alternatif suivant la règle des 3Rs.

b. Tests évaluant le potentiel convulsivant

i. Zébrafish

A côté de l'évaluation comportementale des larves de Zébrafish, il est aussi possible d'évaluer le potentiel convulsivant, soit l'activité d'une molécule à induire des convulsions motrices. Par exemple, en étudiant le candidat médicament à différentes doses dans le milieu de culture des larves de zébrafish ; selon la dose étudiée, si une anomalie du comportement telle l'augmentation de la vitesse de nage est observée, cette dose montre une activité neurotoxique mais aussi le seuil à partir duquel un effet convulsivant est observé.

Il s'agit d'un modèle de *screening* à haut débit des candidats médicaments pour identifier les comportements typiques d'une crise et le potentiel seuil convulsivant.

iii. Modèles de rongeurs

Les études de pharmacologie classique manquent de sensibilité pour étudier le risque proconvulsivant, d'autres modèles ciblant l'évaluation du risque épileptoïde sont requis.

Les modèles de rongeurs utilisés de manière générale dans les études de *screening* des antiépileptiques ont été élargis à l'évaluation du risque proconvulsivant. Les convulsions peuvent être induites chez des rongeurs de différentes manières, soit par un choc électrique qui est directement appliqué sur tout le cerveau, soit par un médicament administré en périphérie (comme le kainate) ou encore par l'exposition au bruit chez certaines souches de rongeurs⁴⁸.

Pour les études concernant le risque de crises sur ces modèles, un candidat médicament aux propriétés convulsivantes serait associé à une diminution du seuil convulsivant.

Modèles de rongeurs pharmacologiques

Plusieurs substances pharmacologiques, les chimioconvulsivants, sont administrées pour induire des crises chez les rongeurs ; entre autres, le kainate, la pilocarpine et le diisopropylfluorophosphate qui sont largement utilisées pour caractériser la physiopathologie des crises. Les chimioconvulsivants augmentent la neurotransmission glutamatergique ou bloquent l'inhibition effectuée par le GABA, ayant pour conséquence l'induction de crises. En augmentant la neurotransmission cholinergique, les crises peuvent apparaître suite à l'hyperactivation cholinergique. Nous allons décrire principalement l'induction de crises chez les rongeurs par le kainate, un agoniste des récepteurs du glutamate qui possède une forte activité convulsivante.

Deux électrodes de surface sont implantées sur le cortex et *cerebellum* des animaux, une autre électrode profonde est implantée dans l'hippocampe pour suivre le tracé EEG. Chez les rats, le kainate est administré en intracérébroventriculaire (ICV) ou par voie intrapéritonéale (IP) induisant ainsi des crises, associées à des décharges épileptiformes qui s'initient dans les structures limbiques et se propagent dans les autres régions du cerveau. Après l'injection de kainate en parentérale, les rats montrent des signes de convulsions en commençant par des secousses, un regard fixe, une exploration et une mastication. L'hyperactivité, le clonus des membres inférieurs et des convulsions tonico-cloniques suivent ces premiers signes. L'activité des crises est classée selon l'échelle de Racine décrite ci-dessous.

Stade 0		Pas de réponse ou immobilisation
Stade 1		Mastication ou contractions musculaires faciales
Stade 2		Mastication et hochement de la tête ou secousses
Stade 3		Clonus (tremblement, secousse) unilatéral des membres inférieurs
Stade 4		Clonus bilatéral des membres inférieurs, pose sur ses membres inférieurs
Stade 5		Clonus bilatéral des membres inférieurs, postérieurs et chute

Table 6. Echelle de Racine décrivant l'activité des crises selon le comportement des rongeurs⁴⁹

La première heure suivant l'injection (en injection ICV ou IP) du kainate, des changements comportementaux sont observés tels un regard fixe, des mouvements de la tête et des secousses suivies de crises motrices de plus en plus fréquentes.

Le kainate a l'avantage de produire des crises persistantes, chez l'animal, associées à des dommages neuronaux qui sont similaires aux zones épileptogènes chez l'Homme.

C'est un protocole simple qui ne requiert pas d'appareillage sophistiqué, mis à part l'enregistrement du tracé EEG. Un inconvénient majeur de ce modèle est la variabilité de la sensibilité des rats selon les souches, le sexe, l'âge et le poids. De plus, il y a une excitotoxicité directe suivant l'administration du kainate qui complexifie l'interprétation entre le dommage neuronal direct et le dommage neuronal lié à la crise.

Ainsi, les modèles de rongeurs pharmacologiques ou dits « chimioconvulsivants » permettent d'étudier la physiopathologie des crises et d'effectuer un *screening* de candidats médicaments de manière rapide mais au risque d'avoir un taux de mortalité important des rongeurs inclus dans l'étude, avec une grande variabilité au niveau de l'incidence et de la sévérité des crises spontanées⁴⁹.

Rongeurs stimulés par un choc électrique

Parmi les modèles de rongeurs stimulés par un choc électrique, nous allons nous intéresser à la stimulation de la voie perforante qui est l'approche la plus utilisée pour induire des crises persistantes chez les rats. Les rats sont anesthésiés et reçoivent une stimulation électrique de la voie perforante (région hippocampique) de manière intermittente pendant 24h, soit des stimulations répétées et tétaniques.

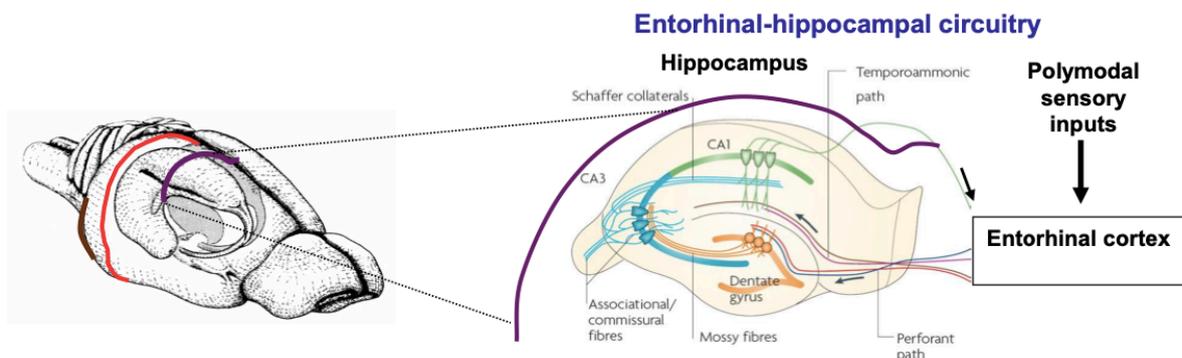


Figure 23. Région hippocampique (dont la voie perforante)⁵⁰

Après stimulation électrique, un EEG est effectué pour suivre l'activité des crises ; ces crises sont ensuite classées selon l'échelle de Racine, décrite dans le modèle précédent.

Induire des crises spontanées par un choc électrique aux rongeurs est moins dommageable que l'administration de substances pharmacologiques comme le kainate qui peut provoquer une excitotoxicité, ceci permet d'obtenir un meilleur contrôle des crises et une reproductibilité des crises.

En revanche, le protocole de stimulation électrique ne permet pas de fournir de spécificité des types cellulaires impliqués dans les crises⁴⁹. De plus, l'implantation d'électrodes est fastidieuse et demande plus de travail par rapport aux modèles de rongeurs pharmacologiques⁴⁹.

Ces tests qui évaluent le potentiel convulsivant posent toutefois des problèmes d'éthique, concernant l'induction de crises convulsives de manière artificielle.

c. EEG

i. Généralités

Une crise (*seizure*) est associée à une activité électrique neuronale qui est synchrone et surtout anormale. En clinique, les crises peuvent différer de l'une à l'autre : une crise peut rester focale (crise simple partielle) ou bien progresser à d'autres réseaux de neurones (crise complexe partielle) jusqu'à se généraliser dans les deux hémisphères cérébraux. Au-delà de la diversité des signes cliniques, il est à savoir qu'une crise peut aussi survenir en l'absence de signes cliniques.

L'EEG s'avère particulièrement utile dans l'évaluation de molécules qui auraient une activité électrique anormale en l'absence de signes cliniques mais aussi pour des molécules dont des signes cliniques anormaux (ex. convulsions) ont été observés, mais qui ne sont pas liés à l'activité électrique neuronale. L'EEG est un examen qui mesure directement et quantitativement l'activité électrique du cerveau⁵¹.

Le signal observé sur l'EEG provient du potentiel post-synaptique neuronal (PPS) (les PAs sont petits et de courte durée pour être enregistrés). Les PPS peuvent être excitateurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSI), soit qui déclenchent une réponse aux neurones post-synaptiques ou qui n'en déclenchent pas, respectivement. La combinaison de ces deux types de PPS induit des ondes cérébrales qui peuvent être mesurables sur l'EEG. Ces ondes cérébrales sont formées d'oscillations qui sont mesurables par l'EEG, elles sont classées en 5 catégories : thêta, alpha, delta, bêta ou gamma⁵². Elles sont généralement de très faible amplitude (de l'ordre du microvolt) et n'ont pas toujours un motif sinusoïdal. La synchronisation de l'activité neuronale de plusieurs neurones fait que l'activité électrique du cerveau peut être détectable sur l'EEG⁵³.

ii. But et applications

Généralement, les industriels introduisent l'EEG dans leurs études de sécurité seulement s'il y a des effets observés sur le SNC au moment des études précoces de toxicologie qui sont définies par l'ICH M3(R2). Les effets fréquemment observés au cours des études précoces de toxicologie, comme l'investigation de la dose maximale tolérée (DMT), sont les tremblements et des troubles neurocomportementaux tels l'ataxie, la myoclonie ou les vomissements. Une fois la DMT définie, les doses de médicaments qui induisent des effets indésirables peuvent ne pas être exploitées par la suite selon le schéma recommandé des études de sécurité préclinique. Un des effets indésirables à considérer est le tremblement qui, lorsqu'il est présent, montre une activité électrique anormale sur l'EEG. Malgré sa prédictibilité et son efficacité, l'EEG ne fait pas parti des prérequis dans la réglementation. L'introduction de l'EEG pendant les études de pharmacologie de sécurité pourraient permettre d'identifier précocement le risque de crises⁵³. L'EEG est d'ailleurs un examen validé pour détecter les crises (*seizures*) que ce soit en préclinique mais aussi en clinique. En préclinique, l'EEG sur animaux peut montrer sur le tracé, des oscillations qui sont répétitives et dont la synchronicité augmente, ce qui pourrait aider dans la prédiction du risque d'apparition de crises. De plus, si la crise se manifeste cliniquement, l'EEG peut donner des informations sur l'initiation de la crise, le type, la durée et la distribution spatiale de celle-ci mais aussi son impact sur l'activité électrique suivant la crise⁵¹.

iii. Méthodes

L'enregistrement de l'activité électrique par l'EEG peut s'effectuer de deux manières, soit avec des électrodes placées au niveau du crâne ou par télémétrie qui consiste à implanter chirurgicalement des électrodes qui envoient le signal enregistré sur un appareil.

L'interprétation d'un signal se fait en se basant par rapport à un signal normal. Pour la détection d'une crise, le signal sur l'EEG montre un tracé typique en pic avant la survenue d'une crise. La montée du pic est plus rapide que la descente, dure 20 à 80ms et présente un voltage élevé (200-300 uV)⁵³.



Figure 24. Morphologie typique en pic sur un tracé EEG⁵³

D'autres caractéristiques d'un EEG où des décharges épileptiformes sont observées sont l'activité rythmique (des tracés EEG qui se répètent en « décharges »), des décharges dites « pointes-ondes », des décharges de pointes et polypointes).

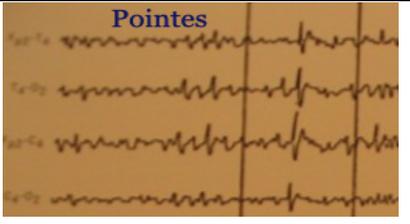
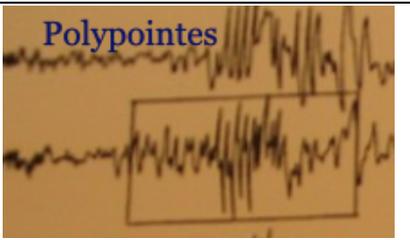
Pointes-ondes	
Pointes	
Polypointes	

Table 7. Tableau récapitulant les tracés EEG qui sont caractéristiques des décharges épileptiformes⁵⁴

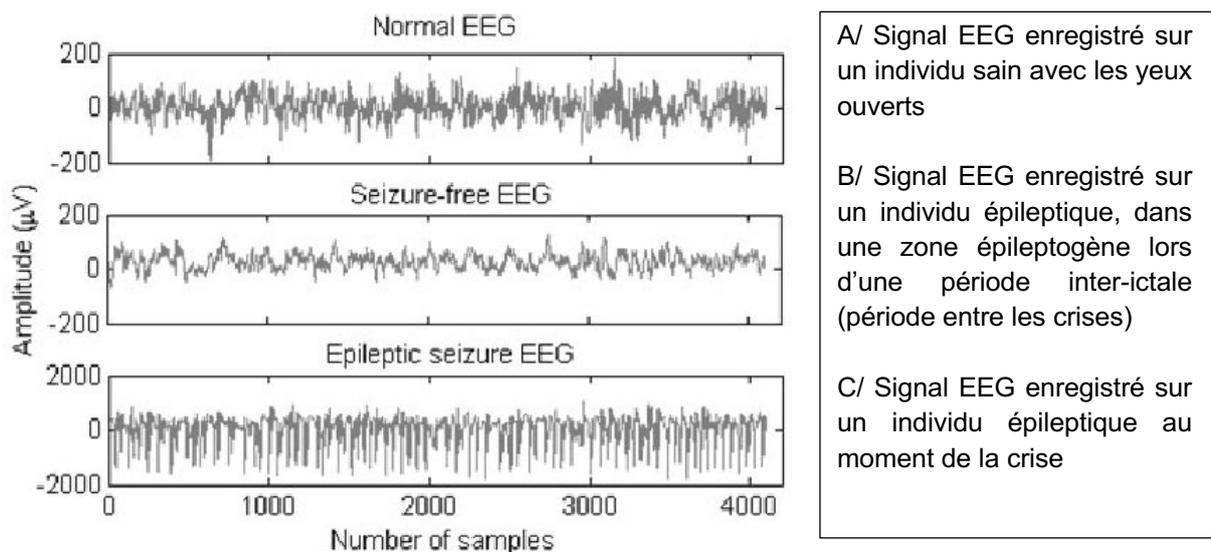


Figure 25. Exemples de tracés EEG normal (A), d'une période inter-ictale (B), d'une crise (C)⁵⁵

Selon les fluctuations du tracé, les différents types de crises peuvent être distingués, par exemple, lorsqu'un tracé présente un pic de 3Hz et est en forme de vague, il est caractéristique des crises d'absence⁵³.

Une description précise est essentielle dans l'interprétation du signal sur l'EEG. Des tracés normaux peuvent être confondus avec ceux des crises ; durant les transitions de cycles du sommeil, une hypersynchronisation peut être observée et est considérée comme normale. Cette hypersynchronisation peut ainsi être confondue avec une crise. Des artefacts peuvent fausser l'interprétation du tracé, il est important de pouvoir distinguer le signal généré par le cerveau et le signal généré par des facteurs externes. Parmi les facteurs externes, les mouvements musculaires constituent des artefacts, les muscles génèrent un voltage plus élevé que celui des neurones. Les mouvements des yeux ou de la langue peuvent aussi constituer des artefacts.

En plus de l'aspect du tracé EEG, l'EEG peut être quantitatif, il s'agit du q.EEG (« q » pour « *quantified* » soit quantifié). Lors des études précliniques, il est intéressant d'évaluer le risque de crises épileptiques d'un candidat-médicament à l'aide du q.EEG. Le q.EEG peut mesurer les effets d'un candidat-médicament sur l'activité électrique du cerveau grâce au spectre de la fréquence des ondes (la fréquence des ondes correspond au nombre de cycles par seconde en Hz). Pour illustrer, l'étude ci-dessous n'évalue pas particulièrement le risque de crises, mais s'intéresse à l'effet de la scopolamine sur la fréquence des ondes cérébrales. La scopolamine augmente la fréquence de l'ensemble des ondes cérébrales et montre un effet indésirable sur le SNC qui est l'amnésie. L'analyse du pourcentage de la fréquence de chacune des ondes cérébrales est basée sur les différences entre le spectre d'un véhicule et celui du médicament testé pour chacune des bandes de fréquence, toutes les 10ms.

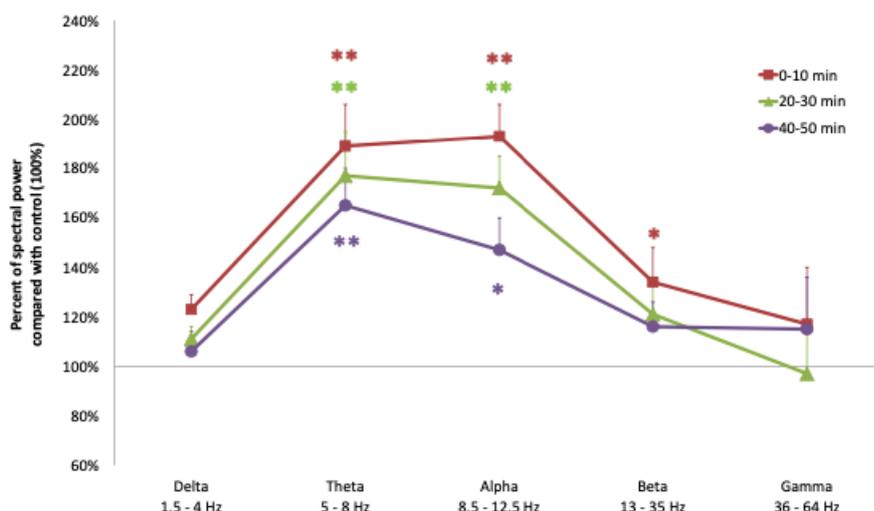


Figure 26. Scopolamine (0,5mg/Kg injectée par voies sous-cutanée à un rat, 30mn avant la mesure de la fréquence des ondes cérébrales)⁵⁶

Treatment	Adverse effects	Delta	Theta	Alpha	Beta	Gamma
Scopolamine	Amnesia	↑	↑↑	↑↑	↑	↑

Le q.EEG est un outil sensible et fiable dans la prédiction d'effets indésirables de molécules sur le SNC⁵⁶, il est capable d'identifier autant une activité sédatrice, stimulante que convulsivante. Cette technique peut beaucoup apporter dans la sécurité du médicament en confirmant les données obtenues par les observations comportementales. De plus, le q.EEG peut fournir directement des données de biodisponibilité cérébrale permettant de déterminer la dose maximale du candidat médicament où aucun effet n'est observable dans le cerveau (pour une indication thérapeutique autre que le SNC)⁴⁸.

iv. Avantages et limites

La détection de crises sur l'EEG pourrait constituer un bon biomarqueur, selon l'aspect du tracé, il est possible de détecter les crises et de définir le type de crises. Bien que l'EEG puisse apporter des informations sur une présumée activité épileptiforme, les enregistrements observés peuvent comporter des artefacts qui peuvent causer des ambiguïtés dans son interprétation. Il est recommandé d'associer l'EEG à la surveillance vidéo au cas où des manifestations cliniques comme les convulsions tonico-cloniques seraient observées au même moment que l'activité neuronale anormale, ce qui prouverait de manière évidente l'activité électrique anormale associée à l'activité épileptiforme.

d. Études précoces *in vivo*

Les études de pharmacocinétique *in vivo* et d'efficacité sont généralement conduites lors des phases précoces de découverte de molécules, avant les études de sécurité. Elles peuvent aider à réduire le taux d'attrition des médicaments, définir les cibles thérapeutiques qui présentent un bon profil de sécurité, optimiser les paramètres de pharmacocinétique (ADME : absorption, distribution, métabolisme et élimination) et réduire les interactions médicamenteuses.



Figure 27. Études ADME qui sont conduites le long du développement pharmaceutique⁵⁷

Durant le développement, les propriétés pharmacocinétiques peuvent aider dans la validation des études de toxicologie, appuyer les études de sécurité qui ont eu lieu avant l'administration de la première dose chez l'Homme⁵⁷. Elles permettent par exemple d'apporter des informations sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et de prédire l'exposition du cerveau à l'efficacité des médicaments ou à leurs effets épiléptogènes. Les observations neurocomportementales durant ces études peuvent fournir des premières données sur le risque potentiel d'induire des crises. Une seule observation d'un signe de convulsion ne conduit pas forcément à la conduite d'études spécifiques au risque de crises. Afin de mieux guider la suite des études, celles-ci devraient être effectuées sur une population large de différentes espèces, aux doses thérapeutiques administrées chez l'Homme et devraient mener à des investigations précoces dans les modèles *in vitro*¹⁴.

V. UNE APPROCHE STRATEGIQUE POUR EVALUER LE RISQUE DE CRISES EPILEPTOIDES

Le risque de crises épiléptoïdes induit par les médicaments constitue une menace potentielle et représente l'une des causes les plus fréquentes de séquelles ou de mortalité au cours des essais cliniques. Les médicaments associés à cet effet indésirable couvrent un ensemble de classes pharmacologiques et différentes aires thérapeutiques. Les médicaments indiqués dans les pathologies du SNC ont montré sans surprises la plus forte propension à induire des crises mais des médicaments indiqués dans les pathologies infectieuses, cardiovasculaires et respiratoires

peuvent présenter un potentiel épileptoïde. Il s'agit d'une préoccupation majeure pour l'industrie pharmaceutique accentuant ainsi la nécessité d'approfondir les études de sécurité à toutes les classes thérapeutiques. Considérant les conséquences ultérieures aux crises épileptoïdes, de grands efforts ont été entrepris pour identifier et atténuer ce risque neurotoxique dès le développement préclinique.

Malgré l'importance de cet effet indésirable, il n'existe pas à ce jour de lignes directrices concernant leur étude. Depuis la rédaction des guidelines ICH S7A dans les années 2000, l'évaluation du risque de crises épileptoïdes a guidé les industriels à partir d'un ensemble de tests recommandés par les agences réglementaires. Cet ensemble de tests ne répond qu'à des exigences minimales et fait défaut dans la détection du risque de crises jusqu'aux phases tardives. De plus, ce risque est généralement révélé lors des études de toxicité à doses répétées, ce qui a amené Astra Zeneca à développer une approche stratégique afin d'évaluer le risque de crises épileptoïdes. Dans les phases précoces du développement pharmaceutique, l'accent est placé sur des tests à haut-débit et sensibles afin de gagner en prédictibilité lors des phases ultérieures. Un arbre décisionnel a été élaboré concernant l'ordre des tests précliniques qui pourraient être suivis¹⁴.

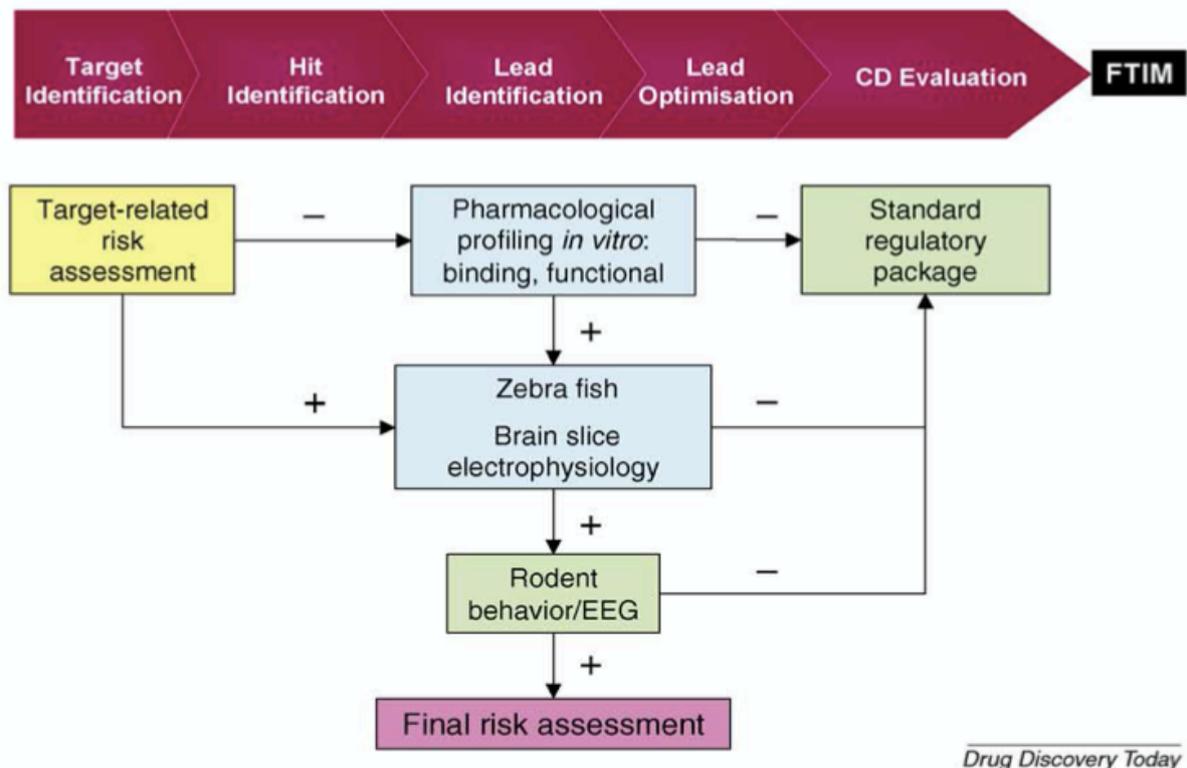


Figure 28. Arbre décisionnel de l'évaluation du risque de crises épileptoïdes

Les différentes étapes d'évaluation du risque de crises. La stratégie proposée par Astra Zeneca consiste en une cascade de tests à prioriser selon le rendement, les ressources requises et la prédictibilité. Si le risque lié à la cible est négatif, les études spécifiques concernant le risque de crises ne seront pas effectuées à moins qu'elles ne soient nécessaires suivant l'étude du profil pharmacologique. Si un risque lié à la cible est identifié, des tests *in vitro* seront entrepris et précéderont les tests *in vivo* si nécessaires. A l'issue de chaque étape, des résultats négatifs mènent à effectuer les tests réglementaires. En revanche, des résultats positifs devront remettre en question les expositions du candidat-médicament et son indication thérapeutique afin d'obtenir une évaluation finale du risque.

Suivre cette approche dépend des résultats obtenus ; par exemple, pour un projet d'étude où les tests *in vitro* et *in vivo* sont en corrélation, ils seraient judicieux de sélectionner les candidats-médicaments à partir des résultats des tests *in vitro*. Si les données précédentes des tests *in vitro* montrent peu de prédictibilité, les tests *in vivo* précoces seraient dans ce cas plus appropriées. Il est aussi important de noter qu'en plus des tests d'évaluation du risque de crises, les études de sécurité concernant la *core battery* doivent être adaptées s'il est nécessaire d'inclure le suivi comportemental ou l'EEG.

Les études de risques liés à la cible sont entreprises avant toute synthèse de composés dans les phases précoces du développement. Si la cible est mise en cause, des tests *in vitro* comme l'électrophysiologie sur tranche de cerveau ou le test zébrafish seront à envisager. Dans le cas par exemple, d'études de nouvelles cibles, la littérature scientifique peut se révéler insuffisante pour effectuer correctement les études de cibles ; il s'agira alors de prendre en compte les anomalies repérées lors des tests de comportements ou lors des études *in vivo* DMPK. Il est noté qu'une seule observation d'un signe de convulsion ne va pas amener systématiquement à une évaluation du risque de crises. En revanche, si l'observation de cet effet a été remarqué au cours d'une étude menée un grand nombre d'animaux, allant d'une espèce animale à une autre, avec des doses proches des doses thérapeutiques, cela peut entraîner à effectuer des études spécifiques du risque de crises afin de « dérisquer » cet effet chez l'homme. Ces observations peuvent aussi amener à faire des études précoces sur des modèles *in vitro*.

Un risque de crises peut être suspecté grâce aux études de profil pharmacologique, effectuées en routine après identification des molécules dites « *lead* ». Si une faible liaison aux cibles impliquées dans le risque de crises est observée, les études réglementaires décrites dans les lignes directrices ICH S7A et ICH M3 sont entreprises.

Si les études de liaison indiquent une forte affinité de la molécule aux cibles impliquées dans le risque de crises (cf. Table 4), cela amènerait à investiguer ce risque à travers la cascade d'étude décrite en figure 28. Dans quelques cas, le risque de crises peut ne pas être identifié avant les études réglementaires, dans ce cas, des études spécifiques du risque de crises devraient être réalisées pour mieux définir le mécanisme d'action de la molécule en question, mais aussi sa marge de sécurité. L'évaluation du risque de crises devrait prendre en compte les résultats des différents tests dont les propriétés pharmacocinétiques (ex : la pénétration de la BHE)

Si la marge de sécurité est jugée correcte, le candidat-médicament peut progresser jusqu'aux phases cliniques ; cependant il n'y a pas de directives réglementaires sur l'acceptabilité de la marge de sécurité concernant le risque de crises, cela dépend de l'indication thérapeutique et de la population cible. Les crises induites par les médicaments sont des effets complexes qui sont généralement évalués tardivement au cours du développement (études *in vivo* comportementales). Il y a donc une pression pour identifier ce risque précocement tout en utilisant autant de ressources qu'avec les approches traditionnelles en *in vivo*. L'approche décrite par Astra Zeneca privilégie les protocoles d'électrophysiologie qui sont plus sensibles mais peu exploités dans l'évaluation du risque de crises épileptoïdes à ce jour, ceci permettrait en plus de réduire l'utilisation d'animaux. Le but de cette approche est d'identifier précocement le risque de crises, soit de réduire l'incidence des signes de convulsions lors des études toxicologie réglementaires. En identifiant de manière précoce ce risque, les volontaires sains et les patients seront mieux protégés tout en évitant l'interruption de la mise sur le marché due à l'apparition de convulsions¹⁴.

VI. DISCUSSION ET CONCLUSION

La pharmacologie de sécurité propose plusieurs stratégies pour identifier le risque de crises au cours du développement. Il s'agit d'une préoccupation importante dans ce domaine puisque ce risque représente l'une des causes d'effets indésirables graves ou de mortalité au cours des essais cliniques. En 2000, les guidelines ICH S7A concernant les études de pharmacologie de sécurité pour les médicaments humains ont été publiées. Ces textes réglementaires ont pour but de protéger les patients en phase III et IV des effets indésirables potentiels du médicament et de réduire l'utilisation inutile d'animaux ou d'autres ressources. Cependant, les tests de pharmacologie de sécurité réglementaires arrivent tardivement dans le développement du médicament. En effet, c'est au moment des études de pharmacologie de sécurité réglementaires

que les effets indésirables surviennent et impactent le développement des candidats médicaments. Les effets indésirables qui affectent le système cardiovasculaire (arythmies, infections myocardiques, valvulopathies) et le SNC (effets neurologiques, psychiatriques et abus) représentent 34% et 11% des médicaments retirés du marché, dans les années 1990 à 2009 respectivement⁵⁸. On estime que ~ 75% de l'ensemble des effets indésirables survenant chez l'Homme peuvent être identifiés dans les phases précoces du développement préclinique s'il y a une recherche qui est mise en place systématiquement sur des modèles valides. C'est la raison pour laquelle des études de pharmacologie de sécurité exploratoires sont proposées. Grâce à cette investigation précoce, les risques liés à la sécurité des candidats médicaments sont minimisés⁵⁸.

Les études de pharmacologie de sécurité exploratoires du SNC ont été mises en place pour évaluer l'habileté des candidats médicaments à moduler les mécanismes physiologiques connus. Par conséquent, lors des phases de sélection et d'optimisation des candidats médicaments dits « *lead* », les risques neurotoxiques potentiellement liés aux cibles moléculaires pharmacologiques et qui sont impliquées dans l'activité proconvulsivante (*entre autres addiction, anxiété, dépression, apprentissage et mémorisation, douleur et nociception, fonctions motrices, sommeil et veille, effets psychomimétiques, dyskinésie, sédation et psychostimulation*) peuvent être identifiés. L'étude du profil pharmacologique est importante afin de déterminer la suite des tests à entreprendre. En effet, les effets indésirables résultent des effets pharmacodynamiques et particulièrement des interactions « *off-target* » (interactions de la molécule avec des sites différents du site d'action primaire) qui pourraient être identifiées précocement lors de l'investigation du profil pharmacologique. Cette étape de recherche devrait être prise en considération et recommandée par les autorités réglementaires dans le développement d'un médicament. Par la suite, si des effets sur le SNC sont révélés sur les candidats médicaments dits "*hits*", une évaluation du risque neurotoxique devrait être envisagée.

Les modèles *in vitro* sont aussi intéressants pour orienter les études *in vivo*. Les cultures de neurones, particulièrement celles à partir d'IPSCs sont maintenant très en vogue pour l'évaluation de la toxicité et du mécanisme d'action. Elles présentent une meilleure correspondance physiologique par rapport aux cellules de lignée et fournissent davantage de données par rapport aux cellules primaires. De plus, les IPSCs dérivés de cellules humaines combinées aux cultures 3D présentent un meilleur potentiel puisqu'elles fournissent un modèle

in vitro plus relevant pour étudier les tests de médicaments et mieux connaître la physiopathologie des crises.

Les modèles *ex vivo* comme l'électrophysiologie sont limités dans l'extrapolation des résultats aux conditions *in vivo*; les tranches de cerveau manquent de circulation systémique qui peut contribuer à l'étiologie d'une crise (ex : réseau neuronal, hormones, température, métabolisme etc...). De plus, l'interprétation des données issues de ce test repose sur la comparaison des composés, impliquant ainsi de tester en parallèle des médicaments de référence. Par conséquent, les résultats obtenus sont généralement d'ordre complémentaires et ne se substituent pas aux données obtenues en *in vivo* ; les résultats permettent de guider les études précliniques qui s'ensuivent, surtout si un risque de crises a été identifié. Ce modèle constitue une approche éthique pour les études *in vivo* des phases de *discovery* précoces⁴¹.

Par rapport aux modèles *in vitro*, les modèles *in vivo* offrent la possibilité d'étudier la pharmacocinétique (études DMPK) et d'approfondir le profil de sécurité des candidats médicaments. Pour les études de pharmacologie de sécurité exploratoire, les larves de zébrafish constituent un intérêt car elles permettent d'évaluer la toxicité organique. Grâce à leur petite taille, les embryons et larves de zébrafish à 5j post-fertilisation peuvent être disposées dans des plaques 384 puits, ce qui permet un criblage rapide de nombreux composés (criblage à haut débit). Le modèle de zébrafish présente l'avantage de fournir des données rapidement comme les tests *in vitro*. De plus, les embryons et larves de zébrafish peuvent être utilisés pour étudier les risques sur les systèmes vitaux (appareil cardiovasculaire, SNC et système respiratoire) et non vitaux (gastrointestinal...) de l'organisme⁵⁸.

Pour continuer dans les études réglementaires, les candidats médicaments qui ont été durement sélectionnés doivent suivre les tests recommandés par l'ICH S7A. De plus, si le médicament à développer est indiqué dans les pathologies du SNC ou dans d'autres systèmes physiologiques, mais qui présenteraient des effets sur le SNC, celui-ci devrait suivre des études préliminaires d'abus et de pharmacodépendance selon le Comité des Médicaments à usage Humain (CHMP) et leur *guideline* « Investigations précliniques de la pharmacodépendance potentielle des médicaments ». De manière générale, ceci implique de caractériser le potentiel de pharmacodépendance en évaluant la pénétration des substances à travers la BHE, d'effectuer des études de liaisons récepteur-ligands (profil pharmacologique), d'utiliser des modèles cellulaires, d'étudier la libération des neurotransmetteurs et leur *turn-over* et d'utiliser des modèles *in vivo* pour évaluer l'activité du SNC. Selon les résultats obtenus, les études spécifiques et réglementaires soient les tests d'Irwin ou de FOB devraient être effectués pour

réduire la probabilité d'échec en phase clinique⁵⁸. Ces tests neurocomportementaux ont l'avantage d'étudier un large panel de paramètres relevant du SNC mais aussi d'autres systèmes (par exemple le système respiratoire avec l'observation de la respiration de l'animal) mais peuvent se révéler insuffisant pour l'étude seule du risque de crises. L'effet du candidat médicament n'est évaluée qu'après une administration unique, il n'est donc pas possible de détecter des crises suite à un traitement chronique ou à une polymédication.

Les modèles animaux autres que les tests d'Irwin ou de FOB permettent de fournir davantage de données de sécurité précoces d'ordre pharmacodynamique sur les systèmes vitaux. De plus, il est possible de mesurer en continu plusieurs paramètres comme la pression sanguine, le rythme cardiaque, le rythme respiratoire, la température et l'activité locomotrice sur les animaux libres grâce à la télémétrie et à la pléthysmographie. Ainsi, les modèles animaux permettent de collecter de nombreuses données de sécurité précoces sur les 3 systèmes vitaux⁵⁸.

Les convulsions, lorsqu'elles sont observées au moment des études précliniques, indiquent que la molécule en question présente déjà un potentiel convulsivant. Cependant, comme nous l'avons vu, les crises ne se manifestent pas toujours en clinique, ce qui nécessite de pratiquer l'EEG lors des études précliniques afin de corréliser aux observations cliniques par le biais de l'activité électrique du cerveau. L'EEG permet de détecter si les candidats médicaments présenteraient un effet sur l'activité électrique neuronale (avec ou sans signes cliniques) et d'étudier la corrélation potentielle entre les tremblements, entre autres signes cliniques, et l'activité électrique anormale. Cet examen permet aussi de définir la nature des tremblements. Les observations cliniques incluant l'ataxie, les secousses de la tête, le nystagmus, l'inclinaison de la tête et nausée/vomissement peuvent être des signes d'un syndrome vestibulaire induit par les médicaments. Le syndrome vestibulaire peut être semblable aux signes cliniques liés à une crise, l'EEG peut ainsi servir à différencier les crises de la toxicité vestibulaire induite par les médicaments. Différencier ces deux signes présente un impact sur les études de pharmacologie de sécurité puisque les crises sont considérées comme un effet indésirable menaçant tandis que le syndrome vestibulaire ne l'est pas.

De manière alternative, une activité électrique anormale « *seizure-like* » peut être facilement induite sur des modèles *in vitro*, par des médicaments dont le potentiel épileptoïde est connu. Néanmoins, même s'il y a des correspondances entre les données *in vitro* et *in vivo*, les méthodes *in vitro* ne devraient pas se substituer aux modèles *in vivo* particulièrement parce qu'il n'est pas possible d'adresser des effets du SNC spécifiques comme les tremblements. Il

s'agira plutôt d'associer les modèles *in vitro* aux autres modèles utilisés dans la pharmacologie de sécurité⁴⁴.

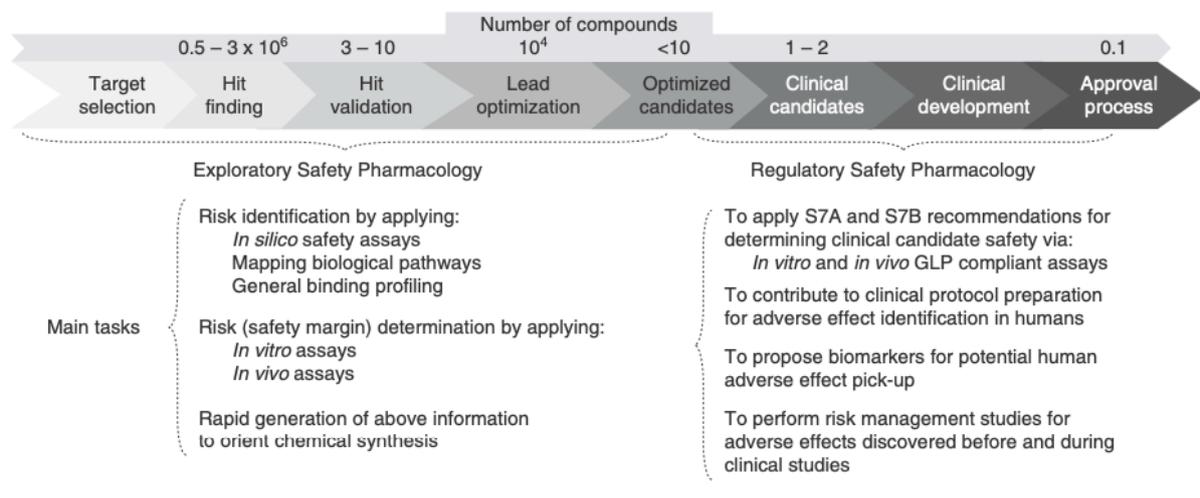


Figure 29. Cycle de découverte, sélection et développement d'un médicament. Le nombre de composés indiqués est approximatif et dépend de nombreux facteurs (structure chimique, classe thérapeutique, innovation...). Les tâches principales des études de pharmacologie de sécurité exploratoires et réglementaires sont listés sur la figure⁵⁸.

Le fort taux d'attrition, dû aux effets indésirables sur le SNC, a conduit au besoin d'effectuer plus de tests de sécurité sur ce système avant l'arrivée des études cliniques. Les effets épileptoïdes suite à la prise d'un médicament représentent plus précisément 20% des facteurs d'attrition ou de retrait de développement d'un médicament⁵⁹.

Entre les années 60 au début des années 2000, les molécules qui ont exercé une action sur le SNC ont représenté 31,4% des cas de retrait du marché des médicaments. En 1996, il y a eu par exemple le retrait du marché du Minaprine®, un inhibiteur réversible la monoamine oxydase-A (MAO-A) indiqué dans le traitement de la dépression, car des convulsions étaient observées en clinique^{58 41}. Dans le tableau suivant sont répertoriés les différents médicaments connus pour induire des crises :

• Bupropion	23%
• Other	12%
• Antidepressants – other	9%
• Diphenhydramine	8%
• Tramadol	8%
• Tricyclic antidepressants	8%
• Amphetamine	7%
• Isoniazid	6%
• Venlafaxine	6%
• Antipsychotic	5%
• Cocaine	5%
• MDMA	3%

Source: Thundiyil JG, Kearney TE, Olson KR. The evolving epidemiology of drug induced seizures reported to a poison control center system. *J Med Toxicol* 2007;3:15-19.

Figure 30. Médicaments induisant des crises épileptoïdes⁶⁰

Lorsque des crises sont observées en clinique, il advient de surveiller ce risque suivant plusieurs aspects : éducations du patient et du personnel soignant, surveillance en phase IV du développement pharmaceutique ou retrait du médicament. Par exemple, le Bupropion, un antidépresseur monocyclique, a été retiré du marché aux États-Unis en 1986 suite à la survenue de crises en clinique mais a été réintroduit sur le marché en 2007 pour son indication principale. Des études prospectives et rétrospectives ont été réalisées sur 10 575 patients traités au Bupropion et il a été rapporté l'apparition de crises convulsives chez 0,3% de ces patients. Des essais randomisés sur 4262 patients ont aussi montré que 34 d'entre eux (soit 0,8%) avaient des crises associées à un traitement au Bupropion⁶¹. Le Bupropion est le médicament qui favorise le plus le début d'une crise (23%)⁶⁰. A ce jour, 16% des médicaments (parmi 462 médicaments) présentant une neurotoxicité (dont les crises) sont retirés du marché⁶².

Le manque de standardisation dans la stratégie d'évaluation du risque de crises, marqué par le manque de recommandations de la part des autorités réglementaires, n'aide pas dans l'évaluation de ce risque. En effet, l'ICH S7A n'a pour seule exigence qu'une évaluation neurocomportementale et motrice dans la batterie de tests à effectuer au cours des études de pharmacologie de sécurité et ne demande pas de tests spécifiques pour la détection du risque de crises épileptoïdes. C'est aux industriels d'adapter leur propre procédure parmi les différentes méthodes d'évaluation du risque de crises afin d'assurer que leur candidat médicament soit dépourvu de risque.

En facilitant l'identification du risque de crises grâce à une stratégie d'évaluation précoce et standardisée, cela permettrait d'améliorer et raffiner la sécurité des candidats

médicaments avant l'arrivée des études précliniques *in vivo* qui sont très coûteuses et contribuerait aussi à une diminution de l'utilisation des animaux dans ces études. Le but primordial est de réduire le taux d'attrition des candidats médicaments et d'augmenter la sécurité des essais cliniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. SIMON, M. Système nerveux. *Cours Pharmacie* <https://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html> (2009).
2. Figure 1.1-Schéma d'un neurone. *ResearchGate* https://www.researchgate.net/figure/Schema-dun-neurone_fig1_280792237.
3. Du nouveau pour l'étude des maladies de la myéline ! *Institut du Cerveau* <https://icm-institute.org/fr/actualite/du-nouveau-pour-letude-des-maladies-de-la-myeline/>.
4. Nervous system anatomy and physiology: Video. *Osmosis* https://www.osmosis.org/learn/Nervous_system_anatomy_and_physiology.
5. Araque, A. & Navarrete, M. Glial cells in neuronal network function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**, 2375–2381 (2010).
6. Neurophysiologie : Cellules gliales ou névroglie (vue d'ensemble). <http://vetopsy.fr/neurophysiologie/cellules-gliales-nevroglie/nevroglie-cellules-gliales.php>.
7. Le système nerveux central _ Généralités.pdf.
8. Microglia - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/microglia>.
9. Action potentials and synapses. <https://qbi.uq.edu.au/brain-basics/brain/brain-physiology/action-potentials-and-synapses> (2016).
10. Le Neurone- cellule fondamentale du système nerveux. <http://www.corpshumain.ca/Neurone.php>.
11. Werner, F.-M. & Covenas, R. Classical Neurotransmitters and Neuropeptides Involved in Generalized Epilepsy: A Focus on Antiepileptic Drugs. *Curr. Med. Chem.* **18**, 4933–4948 (2011).
12. Stafstrom, C. E. & Carmant, L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
13. Fisher, R. S. *et al.* Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472 (2005).
14. Easter, A. *et al.* Approaches to seizure risk assessment in preclinical drug discovery. *Drug Discov. Today* **14**, 876–884 (2009).
15. Roussignol, G. In vitro Preclinical Safety Méthodes Alternatives pour l'évaluation de la Sécurité PréClinique. 77.

16. Rogawski, M. A. Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target. *Epilepsy Curr.* **11**, 56–63 (2011).
17. Anti-N-methyl-D-aspartate (Anti-NMDA) Receptor Encephalitis- A Synopsis. *Psych Scene Hub* <https://psychscenehub.com/psychinsights/anti-nmda-receptor-encephalitis-a-synopsis/>.
18. DeLorenzo, R. J., Pal, S. & Sombati, S. Prolonged activation of the N-methyl-d-aspartate receptor–Ca²⁺ transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14482–14487 (1998).
19. Arundine, M. & Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325–337 (2003).
20. Pugsley, M., Authier, S. & Curtis, M. Principles of Safety Pharmacology. *Princ. Saf. Pharmacol.* 18 (2008).
21. Weaver, R. J. & Valentin, J.-P. Today’s Challenges to De-Risk and Predict Drug Safety in Human “Mind-the-Gap”. *Toxicol. Sci.* **167**, 307–321 (2019).
22. Grainger, A. I. *et al.* In vitro Models for Seizure-Liability Testing Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Front. Neurosci.* **12**, 590 (2018).
23. Authier, S. *et al.* Safety pharmacology investigations on the nervous system: An industry survey. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **81**, 37–46 (2016).
24. Kreir, M. *et al.* Do in vitro assays in rat primary neurons predict drug-induced seizure liability in humans? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **346**, 45–57 (2018).
25. S 7 A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 10 (2006).
26. Castagné, V. *et al.* Central Nervous System (CNS) Safety Pharmacology Studies. in *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* (eds. Vogel, H. G., Maas, J., Hock, F. J. & Mayer, D.) 17–72 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-25240-2_3.
27. Mathiasen, J. R. & Moser, V. C. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **83**, e43 (2018).
28. Irwin Test - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/irwin-test>.
29. K. Pugsley, M. *Principles of safety pharmacology.* (2015).
30. Safety Pharmacology - Creative Biolabs. <https://www.creative-biolabs.com/drug->

discovery/therapeutics/safety-pharmacology.htm.

31. Bowes, J. *et al.* Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 909–922 (2012).
32. S 7 B The nonclinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. 9 (2006).
33. The synapse (article) | Human biology | Khan Academy. <https://www.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/the-synapse>.
34. Pacico, N. & Mingorance-Le Meur, A. New In Vitro Phenotypic Assay for Epilepsy: Fluorescent Measurement of Synchronized Neuronal Calcium Oscillations. *PLoS ONE* **9**, (2014).
35. Sirenko, O. *et al.* Functional and Mechanistic Neurotoxicity Profiling Using Human iPSC-Derived Neural 3D Cultures. *Toxicol. Sci.* **167**, 58–76 (2019).
36. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936216>.
37. Sondes_calciques_synthetiques.pdf.
38. Rapport de stage Helene Le.pdf.
39. Haut, S. R., Bienen, E. J. & Miller, A. Clinical overview of the seizure risk of dalfampridine. *Expert Opin. Drug Saf.* **11**, 651–657 (2012).
40. StemoniX microBrain 3D Assay Ready Plates for HTS. *Molecular Devices* <https://www.moleculardevices.com/en/assets/tutorials-videos/dd/flipr/stemonix-microbrain-3d-assay-ready-plates-for-hts>.
41. Accardi, M. V. Seizure liability assessments using the hippocampal tissue slice_ Comparison of non-clinical species. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **10** (2018).
42. Lein, P. J., Barnhart, C. D. & Pessah, I. N. Acute Hippocampal Slice Preparation and Hippocampal Slice Cultures. **19** (2012).
43. Buzsáki, G. How Do Neurons Sense a Spike Burst? *Neuron* **73**, 857–859 (2012).
44. Accardi, M. V. *et al.* The emerging role of in vitro electrophysiological methods in CNS safety pharmacology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **13** (2016).
45. Mussulini, B. H. M. *et al.* Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. *PLoS ONE* **8**, e54515 (2013).
46. SNC et DALA 2018_OP.pdf.
47. Hortopan, G. A., Dinday, M. T. & Baraban, S. C. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Dis. Model. Mech.* **3**, 144–148 (2010).

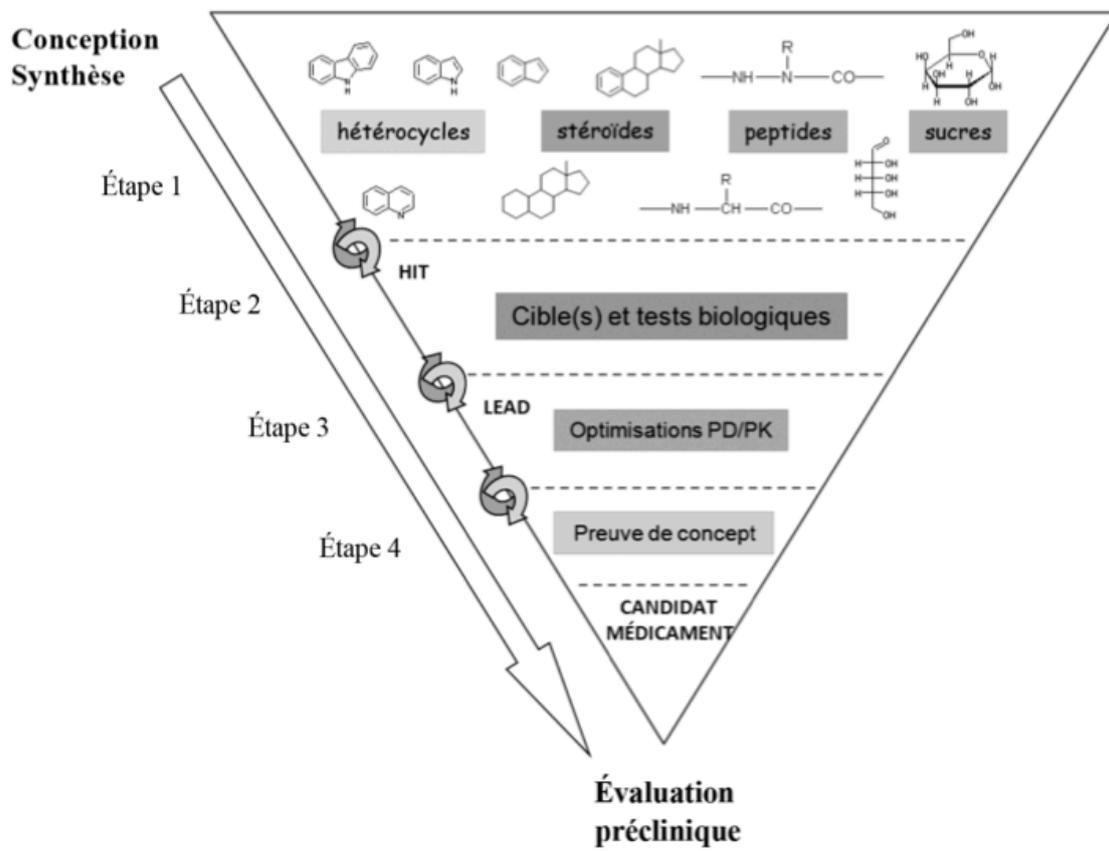
48. Porsolt, R. D., Lemaire, M., Durmuller, N. & Roux, S. New perspectives in CNS safety pharmacology. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **16**, 197–207 (2002).
49. Kandravicius, L. *et al.* Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 1693 (2014) doi:10.2147/NDT.S50371.
50. Bast, T. Synaptic plasticity and hippocampal memory. 12.
51. Metea, M., Litwak, M. & Arezzo, J. Assessment of seizure risk in pre-clinical studies: Strengths and limitations of the electroencephalogram (EEG). *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **75**, 135–142 (2015).
52. Les ondes cérébrales mesurées par le neurofeedback EEG. <https://www.rvd-psychologue.com/neurofeedback-eeg-ondes-cerveaux.html>.
53. Authier, S., Delatte, M. S., Kallman, M.-J., Stevens, J. & Markgraf, C. EEG in non-clinical drug safety assessments: Current and emerging considerations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **81**, 274–285 (2016).
54. Introduction à l'électrophysiologie : EEG - ppt télécharger. <https://slideplayer.fr/slide/10608696/>.
55. Ebrahimpour, R., Babakhani, K., Arani, S. A. A. & Masoudnia, S. EPILEPTIC SEIZURE DETECTION USING A NEURAL NETWORK ENSEMBLE METHOD AND WAVELET TRANSFORM. *Neural Netw. World* **22**, 291–310 (2012).
56. Esneault, E., Peyon, G., Babin, D., Castagné, V. & Froget, G. QUANTIFIED ELECTROENCEPHALOGRAPHY IN PRECLINICAL SAFETY STUDIES. 1.
57. Drug Metabolism and Pharmacokinetic Studies | Charles River. <https://www.criver.com/products-services/lab-sciences/dmpk?region=3696>.
58. Cavero, I. Exploratory Safety Pharmacology: a new safety paradigm to de-risk drug candidates prior to selection for regulatory science investigations. *Expert Opin. Drug Saf.* **8**, 627–647 (2009).
59. Drug Discovery Toxicology | Wiley Online Books. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119053248>.
60. Drug- and Toxin-Induced Seizures. <https://www.reliasmedia.com/articles/18214-drug-and-toxin-induced-seizures?v=preview>.
61. Epileptogenic drugs: a systematic review: Expert Review of Neurotherapeutics: Vol 6, No 4. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.6.4.575>.
62. Onakpoya, I. J., Heneghan, C. J. & Aronson, J. K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med.* **14**, 10 (2016).

Annexe

Annexe 1. Tableau récapitulant les mécanismes d'action des composés décrits dans la partie des cultures de neurones 2D et 3D.

Diazépam	Modulateur allostérique du récepteur GABA _A
Baclofène	Agoniste des récepteurs GABA _B
Carbamazépine	Bloque les canaux voltage-dépendants Na ⁺
Phénytoïne (dilantin)	Bloque les canaux voltage-dépendants Na ⁺
Gabapentine	Apparenté au GABA, n'a pas d'action GABAergique directe Ne bloque pas l'action du GABA
Ethosuximide	Bloque les canaux calciques de type T
Kainate	Agoniste des récepteurs kainate
Lidocaïne	Bloque les canaux voltage-dépendants Na ⁺
GABA	Agoniste endogène des récepteurs GABA
Halopéridol	Antagoniste des récepteurs de la dopamine D ₂
MK-801	Antagoniste des récepteurs NMDA

Annexe 2. Représentation simplifiée des principales étapes de la mise au point d'un candidat médicament



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.