

UNIVERSITE DE BATNA 2  
FACULTE DE MEDECINE  
DEPARTEMENT DE PHARMACIE  
MODULE DE PHARMACOLOGIE

# EVALUATION PRÉ CLINIQUE DE L'EFFET ET DE L'INNOCUITÉ DES MÉDICAMENTS

Dr. ACHACHI.N



ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

# Introduction

- ▶ Avant d' être commercialisé le médicament voir même avant toute administration à l'homme, le médicament passe par plusieurs étape, dites de développement.
  - Ensemble de processus nécessaires à la mise au point d'un médicament présentant les garanties de qualité, de **sécurité** et **d'efficacité** nécessaires.
  - Le point de départ du développement est une molécule chimique et l'objectif final est un médicament apte à être commercialisé.

10 000  
molécules  
criblées

100  
molécules  
testées

10  
candidats  
médicaments

1  
médicament

Recherche  
exploratoire

Tests  
pré-cliniques

Recherche  
clinique

Procédures  
Administratives  
(AMM, remboursement, prix)

Phase de  
commercialisation  
et pharmacovigilance

0

5 ans

10 ans

15 ans

20 ans

+ 5 ans  
maximun

10 ans de recherche et développement

2 à 3 ans

Dépôt  
de brevet

Expiration  
du brevet

Les différentes étapes de la vie d'un médicament de la recherche à la commercialisation

# Introduction

## Développement préclinique des médicaments

Ensemble des étapes de développement réalisées avant la première administration chez l'homme.

### Objectifs

- Détermination du potentiel thérapeutique de la molécule (recherche d'une activité pharmacologique).
- Détermination de son potentiel toxique.
- Détermination de la première dose à tester chez l'homme.
- Détermination de la voie d'administration.
- ▶ La pharmacologie expérimentale permet de sélectionner des molécules présentant une activité pharmacodynamique.
- ▶ La toxicologie expérimentale permet de connaître les effets néfastes des différents molécules sur la santé.

# LA PHARMACOLOGIE EXPÉRIMENTALE

## PLAN

- ▶ Naissance d'un médicament
  - ▶ Le screening pharmacologique
  - ▶ La pharmacologie expérimentale
  - ▶ Le modèle en pharmacologie expérimentale
  - ▶ La réponse biologique en pharmacologie expérimentale
- 

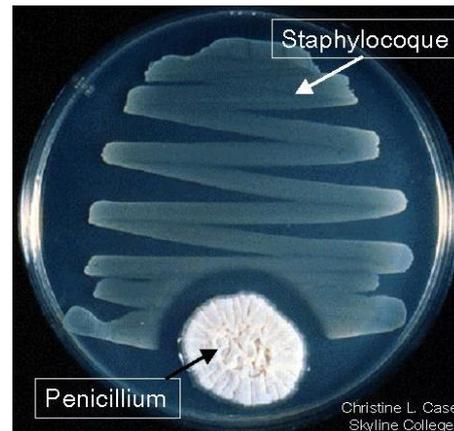
## *Naissance d'un médicament*

### ► Le Hasard

Démarche consistant à faire des découvertes scientifiques importantes par accident ou sagacité, sans qu'elles aient été programmées.

### Exemple :

- La pénicilline.



# I/ Screening pharmacologique

## 1) Définition

C'est soumettre à des essais biologiques des substances prises ou non au hasard afin de rechercher d'une éventuelle activité pharmacologique au moyen de tests standardisés.



# I/ Screening pharmacologique

## 2) Les différents type de screening

### Le screening général

C'est une présélection systématique des molécules sur **plusieurs tests physiologiques appartenant à plusieurs systèmes** (cardio-vasculaire, digestif, respiratoire, reproducteur, etc. ).

Le screening général présente un rendement très faible mais permet de fournir des têtes de séries.

# I/ Screening pharmacologique

## 2) Les différents type de screening

### Le screening orienté

C'est une recherche **d'une ou plusieurs activités**, définies dans **un ou plusieurs domaines**, à l'aide d'un ou de plusieurs tests physiologiques (Exp: recherche de l'activité anti-inflammatoire d'un dérivé stéroïdien).

Le screening orienté permet :

- ▶ l'évaluation de l'activité de molécules préparées dans un but précis,
- ▶ l'établissement de la relation structure chimique/activité pharmacologique.

# I/ Screening pharmacologique

## Actuellement : robotisation du screening

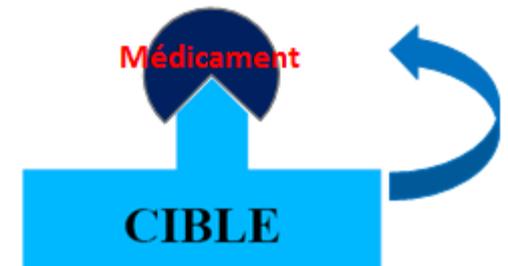
Le screening est abandonné au profit de la modélisation moléculaire après caractérisation d'une cible.

L'étude de tous processus biologique, biochimique ou tout simplement chimique est basée sur:

- Une complémentarité de fonction chimique
- Une complémentarité spatiale de ces mêmes fonctions.



**Modélisation moléculaire**



# I/ Screening pharmacologique

## 3) Modélisation moléculaire

C'est utilisé la puissance de calcul des ordinateurs pour simuler des systèmes chimiques ou biologiques autrement dit c'est la conception de molécules biologiquement actives assistée par ordinateur.



# I/ Screening pharmacologique

## 3) Modélisation moléculaire

- **Identifier une cible** (récepteur, protéine, enzyme) impliquée dans un processus pathologique.
- Modélisation informatique nous permettra **d'établir la structure chimique** d'une molécule susceptible d'interagir avec cette cible.
- Après synthèse chimique de la molécule, L'activité pharmacologique sera confirmée.

Cette démarche vise à la conception d'un **Pharmacophore**

# II/ Pharmacologie préclinique

C'est une étude approfondie des **propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques** de la molécule.

## 1) Etude des propriétés pharmacodynamiques

### Objectifs :

- Etude de la relation dose-effet.
- Caractérisation des cibles.
- Détermination des mécanismes d'action.
- Etude de l'interaction ligand-récepteur.

# II/ Pharmacologie préclinique

## 2) Etude des propriétés pharmacocinétiques

### Objectifs :

- ▶ Mettre au point des méthodes de dosage qui seront utilisées chez l'homme.
  - ▶ Prévoir la pharmacocinétique chez l'homme.
  - ▶ Tenter une corrélation entre taux sanguins et activité pharmacodynamique.
- 

# III/ Le modèle en pharmacologie expérimentale

## 1) Définition

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



## Exemples :

- ▶ Psychotropes : rat, souris.
- ▶ Anticancéreux : souris (transgénique)
- ▶ Anesthésiques locaux : lapin

# III/ Le modèle en pharmacologie expérimentale

## 2) Types de modèles utilisés

Modèles utilisant l'animal entier

Modèles utilisant l'organe isolé

Modèles utilisant la culture cellulaire

# III/ Le modèle en pharmacologie expérimentale

## 2) Types de modèles utilisés

### a. Modèles utilisant l'animal entier

Psychotropes	Rat, souris, chat, chien, singe
Anesthésiques locaux	Lapin
Analgésiques	Souris, rat, lapin,
Antipyrétiques	Lapin, chèvre, limule
Cardio-vasculaire	Chat, chien, cobaye, rat
Appareil respiratoire	Rat
Appareil digestif	Porc, rat, chien, cobaye
Anticancéreux	Rat, souris, chien

L'animal peut être:

- Normal ou pathologique (pathologie induite)
- Eyeillé ou anesthésié

# III/ Le modèle en pharmacologie expérimentale

## 2) Types de modèles utilisés

### b. Modèles utilisant l'organe isolé :

- Modèle intermédiaire: ce sont des organes prélevés chez les animaux et maintenus dans des conditions physiologiques artificielles.
- Permet deux types d'expériences
  - Qualitative
  - Quantitative

**Exemples:** cœur, trachée, intestin, utérus...

# III/ Le modèle en pharmacologie expérimentale

## 2) Types de modèles utilisés

### c. Modèles utilisant la culture cellulaire:

**Culture cellulaire:** technique qui permet la multiplication des cellules dans un milieu artificiel.

- Méthode alternative intéressante
- Étude précise de l'interaction molécule/récepteur:  
Élucide le mécanisme d'action
- Utilisée pour le screening pharmacologique

**Exemple:** culture de cellules cancéreuses

# IV/La réponse biologique en pharmacologie expérimentale

## 1) Types de la réponse biologique

- **Réponse qualitative** : Effet du tout ou rien

**Exemple :**

Souris présentant ou non des convulsions après injection d'une substance pro convulsivante.

- **Réponse quantitative** : réponse mesurable, durée, intensité.

- **Continue** : graduelle (HTA chez le chien)

- **Discontinue** : intermittente (toux chez le chat)

# IV/La réponse biologique en pharmacologie expérimentale

## 2) Evaluation quantitative de l'activité pharmacodynamique

### la dose efficace 50 : DE50

« Dose qui inhibe l'apparition de 50% du symptôme de la pathologie expérimentale induite chez les animaux de laboratoire ».

# IV/La réponse biologique en pharmacologie expérimentale

## 2) Evaluation quantitative de l'activité pharmacodynamique

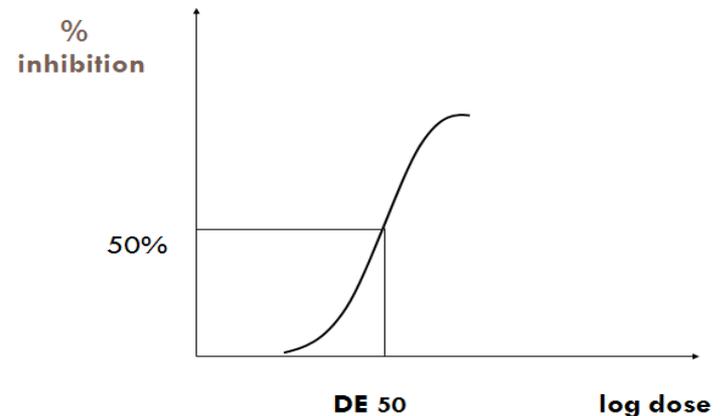
### Détermination

- 1-Administration de la substance médicamenteuse à l'animal.
- 2-Induction de la pathologie.
- 3-Mesure du symptôme caractéristique de la pathologie induite.
- 4-Mesure du % d'inhibition du symptôme par rapport à un lot témoin.

# IV/La réponse biologique en pharmacologie expérimentale

## 2) Evaluation quantitative de l'activité pharmacodynamique

### Détermination



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

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

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

# LA TOXICOLOGIE EXPÉRIMENTALE

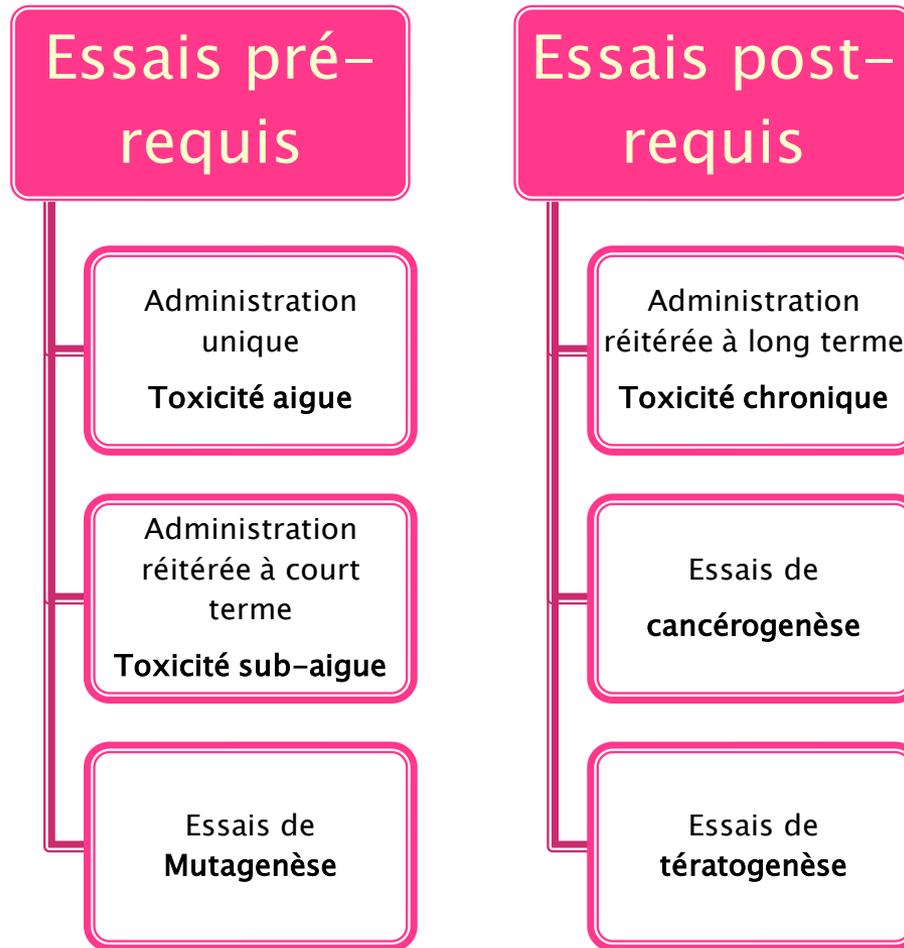
## PLAN

- ▶ Intérêts de la toxicologie expérimentale
- ▶ **Essais pré-requis**
  - I. Essai de toxicité par administration unique ou toxicité aiguë
  - II. Essai de toxicité par administration réitérée : toxicité subaiguë
  - III. Essais de mutagenèse
- **Essais post-requis**
  - I. . Essai de toxicité par administration réitérée : toxicité chronique
  - II. Essais de la cancérogenèse
  - III. Essais sur la reproduction

# Intérêts de la toxicologie expérimentale

- ▶ L'innocuité du produit ou dose maximale tolérée.
  - ▶ Les organes ou les tissus cibles à la toxicité.
  - ▶ Les fonctions physiologiques altérées.
  - ▶ Les risques génotoxiques et cancérogènes.
  - ▶ Les risques de malformation congénitale ou autres toxicités sur la reproduction.
- 

# La toxicologie expérimentale



Essais pré-requis

I-Essai de toxicité par  
administration unique :  
ESSAI DE TOXICITE AIGUE

# Principe et intérêts

- ▶ Evaluation qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et leur évolution dans le temps suite à l'administration d'une dose unique (généralement élevée).
- ❑ **qualitatif** : symptômes + temps d'apparition.
- ❑ **quantitatif** : détermination de la DMM et la DL50.

- Dose minimale mortelle
- Déterminée par IVL ou perfusion continue jusqu'à arrêt cardiaque
- **Intérêt** : choix des doses pour la détermination de la DL50

DMM

- Dose Létale 50
- Dose pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions expérimentales précises
- **but principal de l'essai**

DL50

# Protocole expérimental



Lot témoin :  
véhicule



Lot 1 : Dose 1



Lot 2 : Dose 2



Lot 3 : Dose 3



Lot 4 : Dose 4



Lot 5 : Dose 5



Lot 6 : Dose 6

- 6 doses (ou plus), 6 lots, une dose/lot.
- Pourcentage de mortalité 0 et 100%.
- 10 à 20 animaux par lot.
- Doses croissantes.
- DOSE 2/DOSE 1 = 1.5-1.2
- 2 voies d'administration (celle prévue en thérapeutique + IV « BD absolue »)
- 2 espèces animales (rongeur : souris et rat, non rongeur : chien).
- Animaux homogène (souche, âge, poids, conditions d'élevage...), sexe mâle et femelle.
- Prévoir un lottémoin (véhicule).

# Protocol expérimental

## Durée d'observation

- 14 jours
- En cas d'apparition des signes de toxicité : la durée d'observation est indéterminée.

## Examens

- **Heure** de la mort
- **Nombre** de morts
- **Symptômes**
- **Autopsie +++** ( morts et survivants ) :
  - examens *macroscopiques* des viscères
  - examens *histopathologiques*

# Évaluation

- ▶ L'étude de la toxicité aiguë d'un produit permet d'établir la **relation** entre la **dose** administrée et l'**intensité des effets** observés ainsi que le **calcul de la DL50** avec ses *limites de confiance*.
- ▶ Deux méthodes utilisées pour le calcul de la DL50 :

## 1. Méthode de Karber et Behrens

$$DL50 = DL100 - (\Sigma ab / n)$$

- ▶ **a** : différence entre deux doses successives.
- ▶ **b** : moyenne de morts entre 2 doses successives .
- ▶ **n** : nombre moyen d'animaux par lot

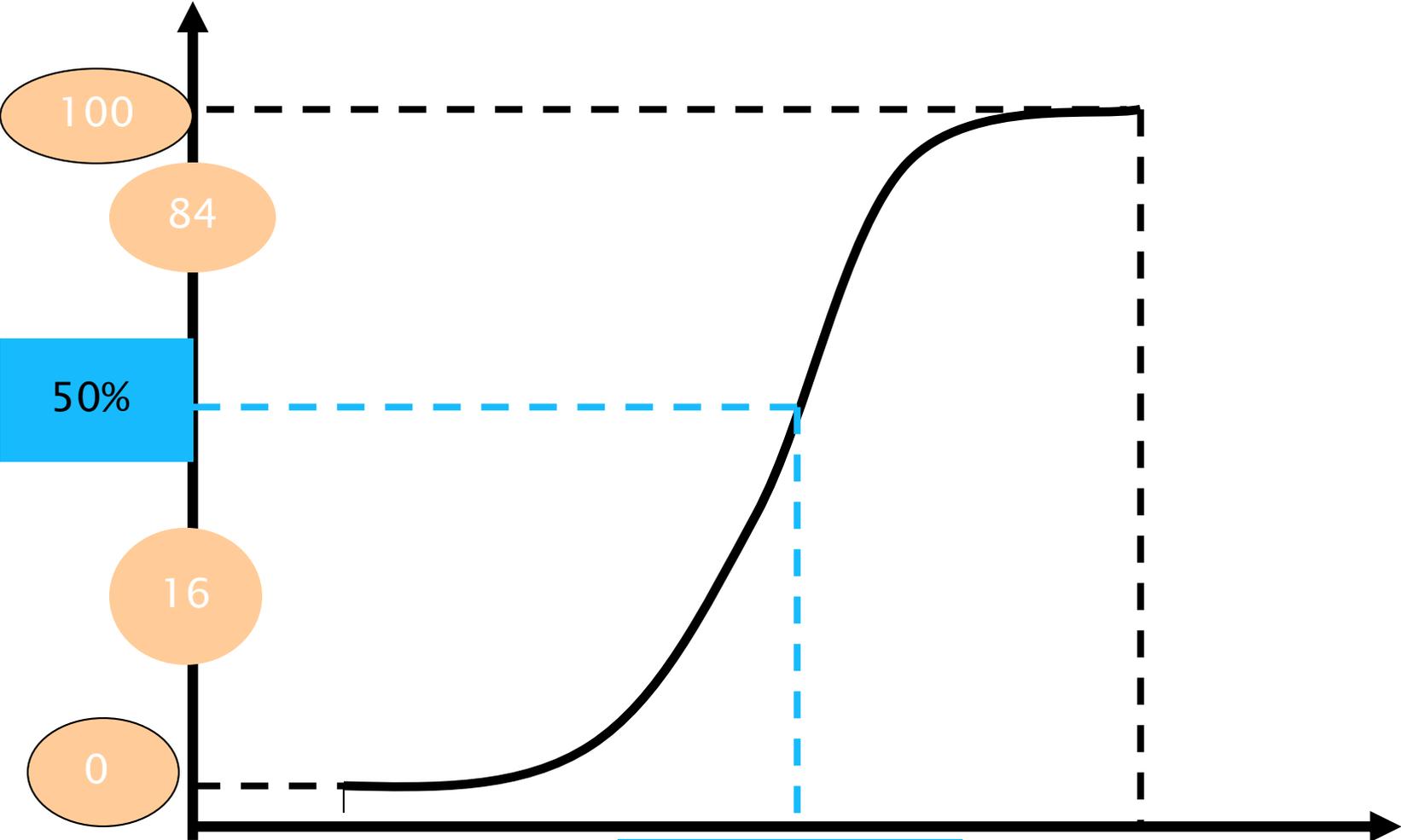
## 2. Méthode de Miller et Trainer

méthode **graphique**

% Mortalité = f ( Log doses)

relation dose / mortalité : Courbe de Trevan

% Mortalité

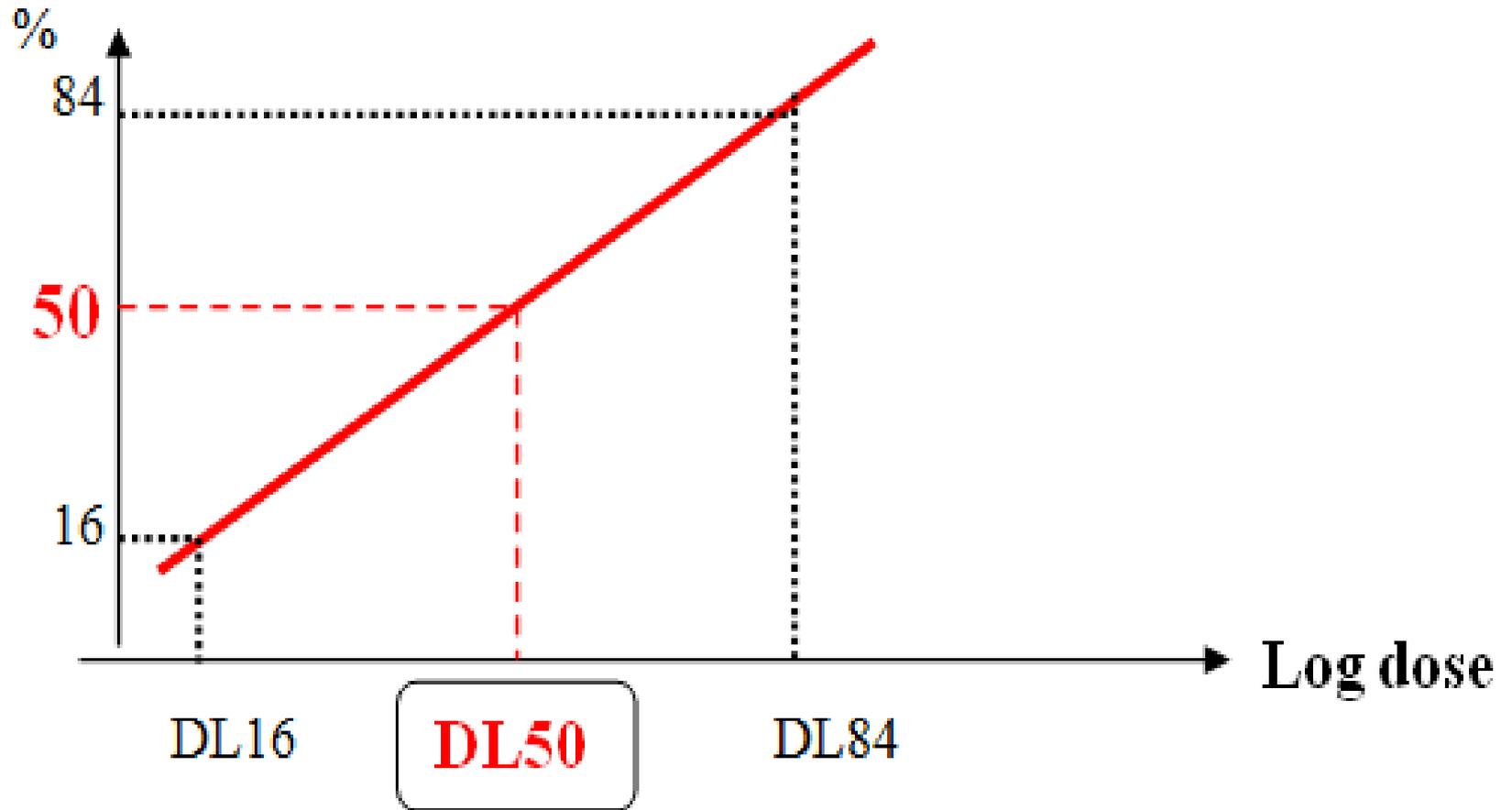


DL50

Log Dose

# Relation dose / mortalité

(papier log - probit)



*Correction de 0% :*  $Y_0 = 50 / n$

*Correction du 100% :*  $Y_{100} = (100n - 50) / n$

**n**: est le nombre d'animaux utilisés dans chacun de ces lots

**Ecart type S :**

$$S = (DL_{84\%} - DL_{16\%}) / 2$$

**Ecart à la moyenne  $\delta$**

$$\delta = 2S / \sqrt{2 n'}$$

**n'** : est le nombre total d'animaux dans les lots ayant donnés des pourcentages de mortalité entre 7% et 93% .

**Résultat :**

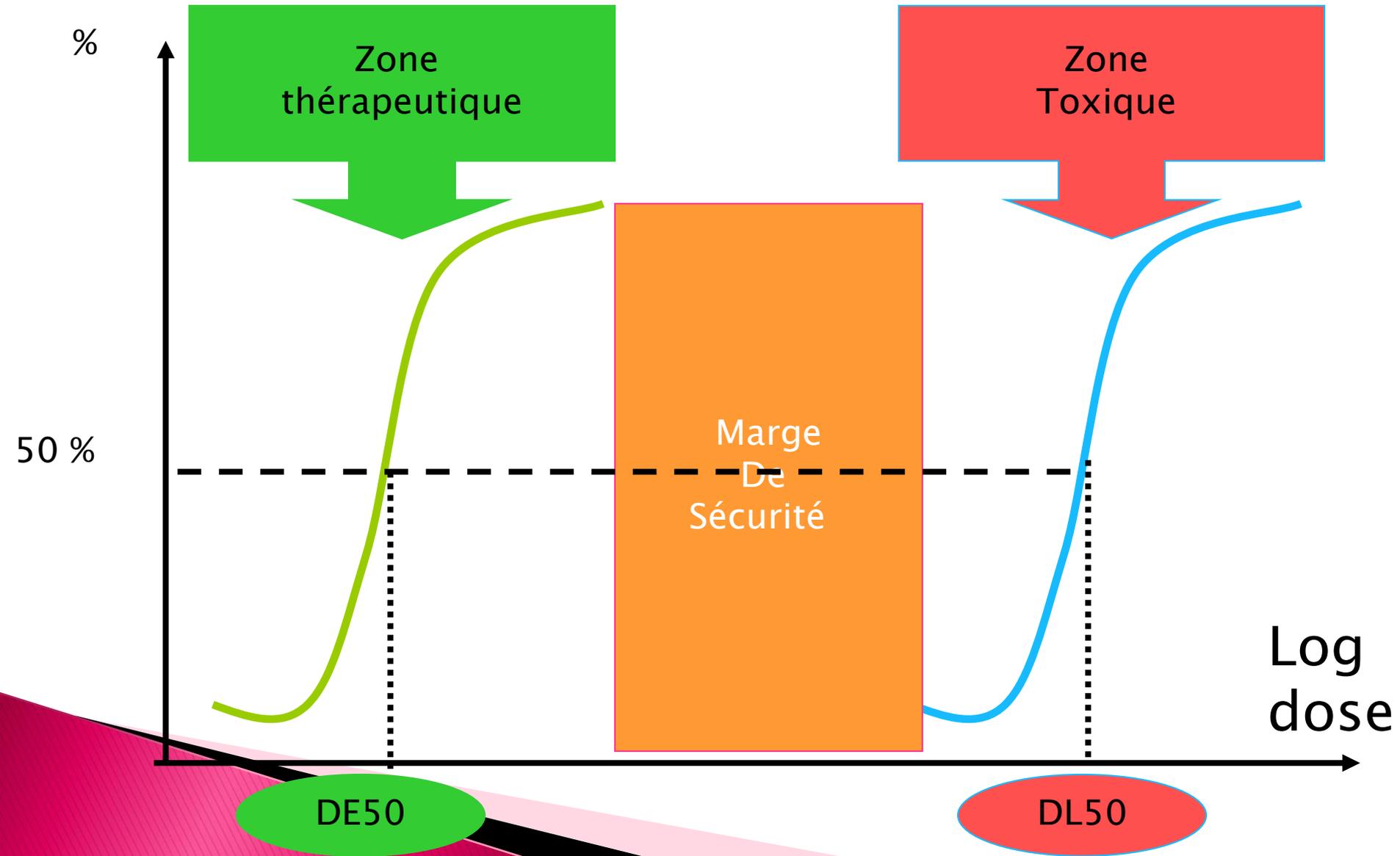
***$DL_{50} = DL_{50} \text{ graphique } \pm \delta \text{ écart à la moyenne}$***

(mg de produit/kg de poids)

# Exploitation des résultats

- ❖ Évaluation quantitative (**dose létale**).
  - ❖ Nature des effets toxiques aigus.
  - ❖ Organes cibles.
  - ❖ **Signes cliniques** / surdosage aigu chez l'homme.
  - ❖ Préparer les **protocoles** de toxicité par administration réitérée.
  - ❖ **Index thérapeutique**.
- 

# Index thérapeutique IT



# Rapport

$$IT = DL50 / DE50$$

IT

faible

Toxiques ++  
théophylline

Moyen  
antibiotiques

large

Toxicité faible  
vitamines

Essais pré-requis

II-Essai de toxicité par  
administration réitérée à  
court terme : ESSAI DE  
TOXICITE SUBAIGUE

# Principe

- ▶ Les effets tardifs d'intoxication peuvent apparaître suite à l'accumulation d'un médicament et/ ou de ses métabolites dans les tissus.
- ▶ **Objectifs des essais par administration répétée :**
  - ✓ Mettre en évidence es **effets toxiques** potentiels et les **modifications physiologiques**, des **altérations fonctionnelles** et/ ou **anatomopathologiques**.
  - ✓ Mettre en évidence les **organes cibles**.
  - ✓ Constater la **réversibilité** de ces modifications
  - ✓ Constater l'existence ou non de phénomènes **cumulatifs** et **d'effets retards**.
  - ✓ Établir les **conditions d'apparitions** en fonction de la posologie.

# Protocole expérimental

- 2 espèces de mammifères :
- Rongeurs : **Rat** +++
- Non rongeur. **Chien** +++, singe, porc

Animaux

- Groupe = 1 lot T + 3 lots essais (3 doses), pour chaque sexe.
- Rats (10 – 30) /gpe/sexe
- Chiens (5 – 10) /gpe/sexe

Constitution des lots

- Celle prévue en thérapeutique (orale +++)

Voie d'administration

- **Dose forte** : symptômes de toxicité pas de mortalité
- **Dose faible** : sans effets toxique
- **Dose intermédiaire** : moyenne des doses précédentes

Les doses

- Journalière

Fréquence d'administration

- > durée d'utilisation chez l'homme

Durée de l'essai

# Protocol expérimental

Durée du traitement	Durée de l'essai
1 ou plusieurs / jour	2 semaines
Doses répétées jusqu'à 7 jours	4 semaines
30 jours	3 mois
> 30 jours	6 mois

# Protocol expérimental

## ▶ Examens

- Comportement / croissance / alimentation
- Explorations fonctionnelles (ECG, rénale, hépatiques...)
- Examens hématologiques et biochimiques
- Étude toxico cinétique
  
- Autopsie : Examens anatomopathologiques
  - ✓ Examens macroscopiques
  - ✓ Examens histo-pathologiques
  
- Réversibilité après sevrage

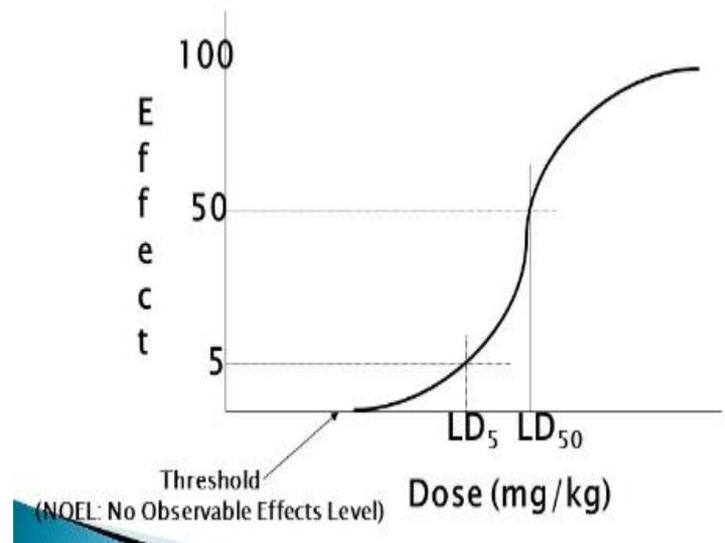
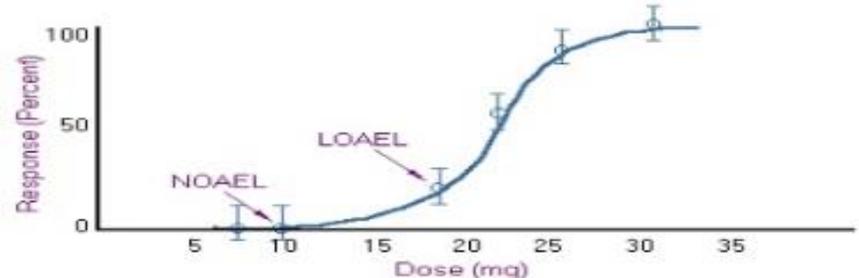
# Exploitation des résultats

- ▶ La dose maximale sans effet néfaste observé DMSENO ou « No Observed Adverse Effect Level : NOAEL » : la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique significatif, clinique, biologique ou anatomopathologique n'est relevé par rapport aux lots témoins.
- ▶ La nature et le site des effets toxiques (organes cibles).

## Dose Levels and Toxicity

Increasing dose  
Safe  
↓  
Less safe

- NOEL: No-Observed Effect Level
- NOAEL: No-Observed-Adverse Effect Level
- LOAEL: Lowest-Observed-Adverse Effect Level
- MTD : Maximum Tolerated Dose
- LD50: Lethal Dose to 50% of population



Essais pré-requis

III-Essais de mutagénèse

# Définition

- ▶ **Modification brusque, permanente et transmissible** du génotype par changement dans le nombre ou la qualité des gènes.
- ▶ Caractère : dominant ou **récessif** + + +

## Mutations géniques

- Ponctuelle :  
addition ou perte  
de paires de bases
- Substitution par  
paire erronée

## Aberrations chromosomiques

- Effet clastogène
- Structure (délétion,  
translocation,  
inversion)
- Changement du  
nombre de  
chromosomes

## Effets sur l'ADN

- Défaut de  
réparation

# Intérêts

- ▶ **Révéler** les modifications occasionnées par une substance au matériel génétique, qui peuvent rendre la descendance différente de l'ascendance de façon permanente et héréditaire.
- ▶ La **relation étroite** entre mutagenèse et cancérogenèse : l'essai de cancérogenèse est long → essais de mutagenèse = **screening rapide**.

# Différents tests

## Tests in vitro

- Procaryotes
- Bactéries : salmonelles , E.coli
- Eucaryotes
- Levures : Saccharomyces
- cervisiae
- Cellules de mammifères en cultures :
- Lymphoblastes humains
- Lymphomes de souris
- Cellules CHO d'Hamster chinois

## Tests in vivo

- Insectes : Drosophila mélanogaster
- Rongeurs :
- souris +++

# Mutations géniques

# I. In vitro

## Test d'AMES

Procaryotes

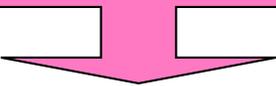
**Principe** : Détection de mutation reverse  
gène muté en type sauvage

Test de référence

**Salmonella typhimurium**

Souche mutée « His - »  milieu riche en histidine

Agent mutagène



Souche sauvage « His+ »  croître en l'absence d'his

Cellules de mammifères en culture

**MLA (Mouse Lymphoma Assay)**

**Principe** : gène **Thymidine kinase**  
Résistance à un analogue de thymidine TFT  
Test de référence

Lymphomes  
hétérozygotes  
TK + / -



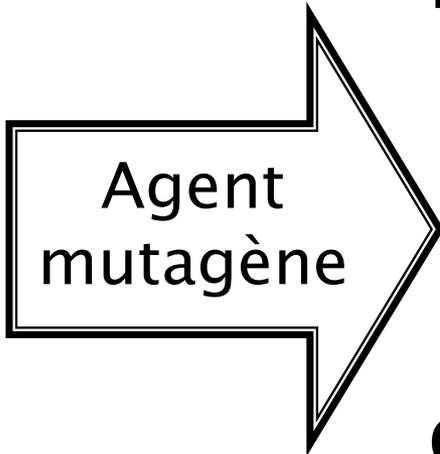
Phosphorylation de TFT



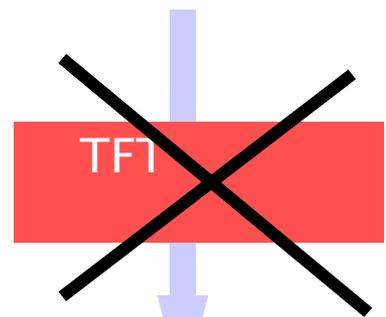
Dérivé cytotoxique



**Mort cellulaire**



Mutation TK- / -



**Croissance colonies**

## II. In vivo

**Insectes** : **Drosophila mélanogaster** +++

### Principe

**Larves**

Produit à tester



**Mouches**

Modifications  
phénotypiques  
(taille, couleur..)

## II. Aberrations chromosomiques

# 1. Tests in vitro

sur chromosomes humains en métaphase

## Principe

Introduction de la molécule à tester

Division *stoppée en métaphase / colchicine*

Examen microscopique (caryotype)

Test de référence



## II. Tests In vivo : rongeurs (souris +++)

### Test du micronucleus sur érythrocytes

#### Principe

molécule à tester



animaux sacrifiés



moelle osseuse / fémur



nombre de micronucleus dans les érythroblastes  
(chromosome entier / fragment) non incorporé dans le  
noyau pendant la mitose)



plus de 0.5%



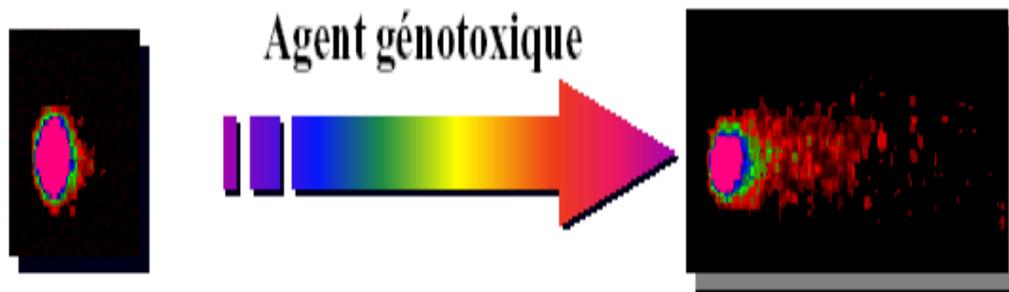
mutagénicité.

### III. Effets sur l'ADN

# Test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

## Principe

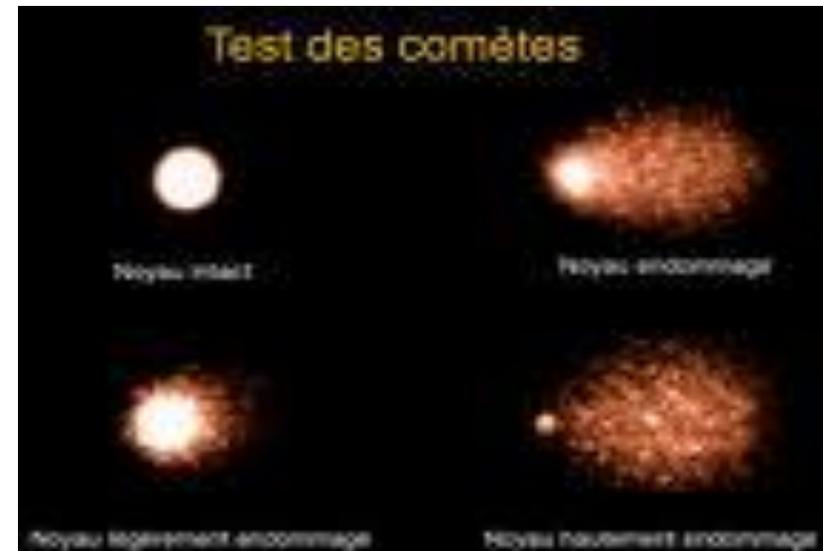
technique électrophorétique, met en évidence des altérations primaires de l'ADN( cassures d'ADN simple ou double brin)



Cellule intacte

Cellule lésée

ADN étiré vers l'anode (+)  
proportionnellement  
au nombre de cassures de brin



# Essais post-requis

I-Essai de toxicité par  
administration réitérée à  
long terme : ESSAI DE  
TOXICITE CHRONIQUE

# Protocol expérimental

- 2 espèces de mammifères :
- Rongeurs : **Rat** +++
- Non rongeur. **Chien** ++, singe, porc

Animaux

- Groupe = 1 lot T + 3 lots essais (3 doses), pour chaque sexe.
- **Rats** au moins 10/gpe/sexe
- **chiens et singe** au moins 4/gpe/sexe

Constitution des lots

- 2 voies d'adm
- Celle prévue en thérapeutique (orale +++)
- Une autre qui assure une bonne résorption

Voie d'administration

- **Dose forte** : symptômes de toxicité pas de mortalité
- **Dose faible** : sans effets toxique
- **Dose intermédiaire** : moyenne des doses précédentes

Les doses

- Journalière

Fréquence d'administration

- **Supérieure ou égale** à la durée de l'essai clinique
- 2 ans chez le rat
- 7 ans ou plus chez le chien et le singe

Durée de l'essai

# Examens

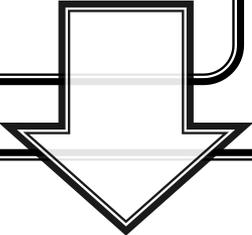
- Comportement / croissance / alimentation
- Explorations fonctionnelles (ECG, rénale, hépatiques...)
- Examens hématologiques et biochimiques
- Mortalité
- **Autopsie : Examens anatomopathologiques**
  - ✓ Examens macroscopiques
  - ✓ Examens histo-pathologiques

# Exploitations des résultats

## Les objectifs

- ▶ Définir la nature de la toxicité.
- ▶ Déterminer la dose sans effet observé.

Si la toxicité n'est pas trop grave et la dose sans effets observés était définie



Une dose journalière peut être extrapolée à partir des données animales

Essais post-requis

II-Essai de cancérogénicité

# Définition d'un cancer

- ▶ **Multiplication incontrôlée** d'une cellule somatique anormale, jusqu'à la formation d'une masse principale (**tumeur primitive**) et de masses satellites (**métastases**).
  - ▶ Transformation par **mutations** et/ou **instabilité génétique**.
  - ▶ Les **altérations génétiques** perturbent l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération tissulaire.
- 

# Objectifs

Dépister les agents capables :

- ▶ D'induire des tumeurs non spontanées par rapport aux témoins.
  - ▶ D'augmenter l'incidence des tumeurs spontanées.
  - ▶ De raccourcir le temps de latence des tumeurs spontanées.
- 

# Indications

- ▶ Ils suivent les recherches de mutagénicité, et doivent être effectuées pour les substances :

Présentant une analogie structurale avec des composés reconnus cancérigènes.

Appartenant à une classe de molécules présentant de nombreux cas de carcinogénicité

Provoquant des manifestations suspectes lors de l'étude toxicologique à long terme.

Susceptibles d'être administré au cours d'1<sup>e</sup> période prolongée de la vie.

Dont les tests de mutagénicité se sont révélés positifs.

# Principe

- ▶ Administrer de façon prolongée  $\neq$  doses d'1 mdt à 1 nbre Important d'animaux dès le sevrage et pendant la majeure partie de leur vie.
- ▶ Effectuer des examens macroscopiques et microscopiques des tissus des animaux morts ou sacrifiés.
- ▶ But : la recherche de tumeurs / comparaison à 1 Témoin.

# Protocole expérimental

## L'espèce animal

- 2 espèces animales + similitudes métaboliques avec l'homme
- **Souris, le rat et l'hamster.**

## Le nombre d'animaux

- Lots de **50 Ax** de chaque sexe par dose, y compris les **lots témoins**

## La durée de TRT

- 24 mois pour la souris et l'hamster
- 30 mois pour le rat

## La voie d'administration

- Celle utilisée chez l'homme

## Le rythme d'administration

- Administration quotidienne

## Les doses

- 2 à 3 doses

1<sup>e</sup> Dose (+)  
Forte

DMT : Produit des signes de toxicité sans réduire la durée de vie des animaux (essai de toxicité sub- $\hat{A}$ ).

2 Doses <

Des fractions de la DMT 1/2 ou 1/4. Permettre à l'animal de survivre en bonne santé jusqu'à l'apparition de tumeur.

Lot témoin

Reçoit uniquement l'excipient.

# Examens et résultats

Les examens cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques : détection et description d'hyperplasie, des tumeurs bénignes et malignes, ainsi que les métastases.

Tous les animaux morts ou mourants doivent être autopsiés; et les survivants à la fin de l'étude doivent être sacrifiés.

L'examen histopathologique est obligatoire pour le diagnostic du cancer.

La conclusion sur la présence ou l'absence d'effet cancérigène d'un produit dépend donc d'un diagnostic délicat portant souvent sur des cas douteux, difficiles à trancher

**La molécule à tester ne doit pas être cancérigène**

Essais post-requis

III-Essai de toxicité sur la  
reproduction

# Classification des effets toxiques sur la reproduction

**Sur la fertilité (♀ et ♂)**

Libido, comportement sexuel, spermato/ovogenèse, activité hormonale, physiologie de la fécondation, développement de l'œuf y compris l'implantation.

**Sur le fœtus et nouveau né :** Action tératogène, effet sur le développement prénatal et post-natal.

\* Embryo/foetotoxicité :  
↓ poids, retard de croissance, toxicité sur les organes, mortalité, avortement, tératogenèse.

\* Anomalies fonctionnelles pré/post natales :

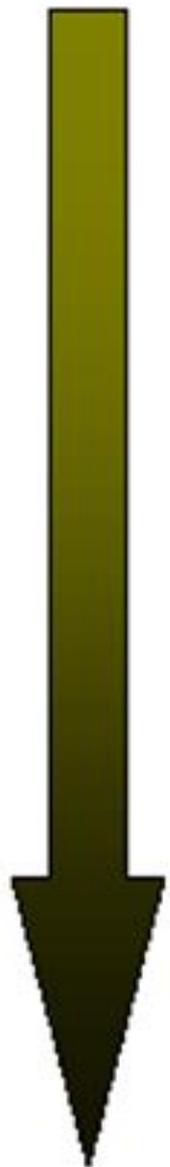
Altération du développement mental ou physique post-natal y compris le développement pubertaire.

# But

Mettre en évidence tout effet :

- ▶ Sur le comportement d'accouplement.
  - ▶ Le maintien ou la perte du fœtus.
  - ▶ Apparition d'anomalies fœtales.
  - ▶ Atteinte plus tardive de la descendance.
- 

# Les étapes de la reproduction des mammifères



Gamétogenèse

Accouplement

Fécondation

Nidation / implantation (œuf)

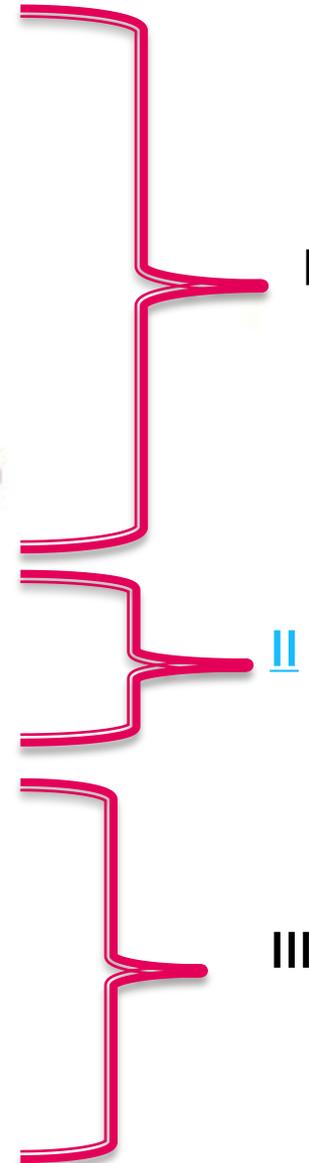
Embryogenèse

Fœtogenèse

Parturition (accouchement)

Lactation

Croissance des descendants



# Protocole expérimentale

**Trois niveaux d'investigation = Trois segments**

- **Segment I** : étude sur la fertilité.
- **Segment II** : étude d'embryotoxicité et de foetotoxicité.
- **Segment III** : étude de péri et post natalité.

**Le produit à tester ne doit pas présenter  
une reprotoxicité**

# Segment I : Étude de la fertilité et développement embryonnaire précoce

- ▶ Etude de l'impact du produit sur les gamètes mâles ou femelles (stérilité, malformation).

## Effets évalués

- ▶ Maturation des gamètes,
- ▶ Comportement de reproduction,
- ▶ Fertilité,
- ▶ Embryon: stade pré-implantation, implantation.

## Animaux

- ▶ 16 à 20 Rats / sexe / dose.

## Traitement

- ▶ ♂ : 4 à 10 semaines avant l'accouplement.
- ▶ ♀ : 2 semaine avant l'accouplement jusqu'à la nidation.

## Accouplement

- ▶ 1 ♂ + 1<sup>e</sup> ♀
- ▶ Durée : 2 à 3 semaines.

## 3 combinaisons

- ▶ Fertilité du ♂: ♂ Traité × ♀ non traitée
- ▶ Fertilité de la ♀: ♀ Traitée × ♂ non traité
- ▶ Fertilité ♂ et ♀ : ♀ Traitée × ♂ Traité

# Segment II : Étude d'embryotoxicité et de fœtotoxicité

- ▶ **Tératogenèse** : apparition des malformations congénitales au cours du développement embryonnaire (segment II) après exposition de la femelle gestante à des facteurs d'altération.
- ▶ Les femelles gestantes (souris ou rattes) sont traitées par le produit à tester pendant la période de l'**organogenèse embryonnaire**.
- ▶ 2 jours avant la parturition (mise bas), les femelles sont sacrifiées et les utérus prélevés.
- ▶ **Noter pour chaque femelle** :
  - Les sites d'implantation.
  - Les sites de résorption (mort *in utéro*).
  - Les éventuelles malformations.
  - Le poids et le sexe du fœtus.

# Segment III : Etude de péri et post natalité

- ▶ Les femelles sont traitées par le produit à tester de la fin de la gestation jusqu'à la fin de la lactation.
- ▶ Administration du produit aux ♀ gestantes (souris, rattes) quelques jours avant mise bas et pendant toute la durée de l'allaitement.
- ▶ **Évaluation des effets de la molécule sur :**
  - Le développement final du fœtus.
  - La mise bas.
  - La lactation.