

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 21 mars 2016

Par Mlle Sandra NOURRY

*La cardiotoxicité des candidats médicaments :
Méthodes d'évaluation préclinique en pharmacologie de sécurité*

Membres du jury :

Président : GARCON Guillaume, Professeur des Universités (Toxicologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

Assesseur(s) : PLATEL Anne, Maître de Conférences (Toxicologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

DURIEZ Patrick, Professeur des Universités (Physiologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

Membre(s) extérieur(s) : TORDJMAN Charles, Docteur en Pharmacie, Directeur Pharmacologie de Sécurité, Institut de Recherches Servier

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille**

3 rue du Professeur Laguesse - BP 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03 20 96 40 40 - 📠 : 03 20 96 43 64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Pr. Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Pr. Alain DUROCHER Pr. Régis BORDET Pr. Eric KERCKHOVE Pr. Eric BOULANGER Pr. Frédéric LOBEZ Pr. Damien CUNY Pr. Benoit DEPREZ Pr. Murielle GARCIN M. Pierre RAVAUX M. Larbi AIT-HENNANI M. Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	M. Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Pr. Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Pr. Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie :	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche :	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité :	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante :	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	M. Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités (suite)

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie

Liste des Maitres de Conférences (suite)

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie

Liste des Maitres de Conférences (suite)

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3 rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tél. : 03 20 96 40 40 - Télécopie : 03 20 96 43 64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mes co-directeurs de thèse, Anne Platel et Charles Tordjman pour leur soutien, leurs conseils et leur disponibilité tout au long de la rédaction de cette thèse d'exercice.

Je souhaite également remercier l'ensemble de mon jury, les professeurs Guillaume Garçon et Patrick Duriez, le Docteur Charles Tordjman ainsi que Anne Platel, qui ont accepté de s'investir dans le jugement de mon manuscrit et qui me font l'honneur de présider mon travail qui signe la fin de mes études de pharmacie.

Je remercie enfin l'ensemble des membres de ma famille qui ont su me soutenir tout au long de mes études de pharmacie jusqu'à l'étape finale de ma thèse d'exercice.

Table des matières

I)	La toxicité cardiovasculaire, aspect clinique et impact sur la santé humaine	15
II)	Mécanismes de toxicités cardiovasculaires induites par les médicaments.....	19
1)	Rappel : anatomie et physiologie cardiaques	19
a)	Le cœur	19
b)	Activité électrique cardiaque	20
c)	Les vaisseaux sanguins	22
d)	Régulation par le système nerveux autonome	22
2)	Arythmies	23
a)	Activité électrique cardiaque	23
a)	Les torsades de pointe	26
b)	Fibrillation auriculaire.....	28
3)	Ischémie myocardique et syndrome coronarien aigu (SCA).....	29
4)	Insuffisances cardiaques	31
5)	Impacts sur la pression artérielle.....	32
a)	Hypertension	32
b)	Hypotension	34
6)	Cas particulier de la toxicité cardiovasculaire des anticancéreux.....	35
a)	Dysfonction ventriculaire gauche.....	36
b)	Ischémie myocardique.....	37
c)	Thromboembolismes veineux	38
d)	Hypertension	39
III)	La pharmacologie de sécurité.....	40
1)	Naissance de la Pharmacologie de Sécurité et guideline ICH S7A	40
2)	Evolution réglementaire de la pharmacologie de sécurité	43
a)	La ligne directrice ICH S7B et évaluation préclinique du risque pro-arythmique	43
b)	La ligne directrice ICH E14 et évaluation clinique du risque pro-arythmique	44
c)	Perspectives : la réglementation CiPA	44

IV) Modèles précliniques d'évaluation de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments.....	46
1) Modèles standards	47
a) « Binding ».....	47
b) Patch clamp manuel et automatique.....	51
c) Fibre de Purkinje	52
d) Cœur isolé de Langendorff	53
e) Animaux télémétrés	54
f) Animaux anesthésiés	56
g) Marqueurs de toxicité cardiovasculaire	57
2) Modèles émergents	61
a) Méthodes <i>in silico</i>	61
b) Cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines.....	63
V) Stratégie de développement de détection précoce de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments.....	66
VI) Discussion	71

Liste des abréviations

ADME	:	Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination
AINS	:	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
AMM	:	Autorisation de Mise sur le Marché
APD	:	Action Potential Duration
BPL	:	Bonnes Pratiques de Laboratoire
CHO	:	Chinese Hamster Ovary
CiPA	:	Comprehensive <i>In Vitro</i> ProArrhythmia Assay
COX	:	CycloOXYgénase
CSRC	:	Cardiac Safety Research Consortium
EAD	:	Early After Depolarization
ECG	:	ElectroCardioGramme
ELISA	:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	:	Food and Drug Administration
FEVG	:	Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche
5-FU	:	5-Fluorouracil
GDP	:	Guanosine DiPhosphate
GPCR	:	G Protein-Coupled Receptor
GTP	:	Guanosine TriPhosphate
HEK	:	Human Embryonic Kidney
hERG	:	Human Ether-à-gogo Related Gene
HESI	:	Health and Environmental Sciences Institute
hiPSC-CM	:	Human Induced Pluripotent Stem-Cells Cardiomyocytes
ICH	:	International Conference of Harmonization
NOAEL	:	No Observed Adverse Effect Level
3Rs	:	Réduire, Raffiner, Remplacer
SCA	:	Syndrome Coronarien Aigu
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Index des Figures/Tableaux

Figure 1 : Causes d'attrition des molécules en développement en 1991 et 2000.....	15
Figure 2 : Anatomie du cœur.....	19
Figure 3 : Relation entre ECG et potentiels d'action cardiaques.....	21
Figure 4 : Schéma du système nerveux autonome.....	23
Figure 5 : Potentiel d'action ventriculaire cardiaque.....	24
Figure 6 : Relation entre potentiels d'action et l'électrocardiogramme.....	25
Figure 7 : ECG d'une torsade de pointe réalisé sur un chien présentant une anomalie congénitale.....	26
Figure 8 : Relation entre potentiel d'action et intervalle QT de l'ECG en situation physiologique et en situation de prolongation de l'intervalle QT.....	27
Figure 9 : Mécanismes d'action de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	37
Figure 10 : Batterie de base pour l'étude de la pharmacologie de sécurité.....	42
Figure 11 : Stratégie d'évaluation préclinique du risque pro-arythmique décrite dans ICH S7B.....	43
Figure 12 : Naissance et évolution de la pharmacologie de sécurité.....	45
Figure 13 : Mécanisme de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	50
Figure 14 : Système de patch clamp manuel sur cellule HEK293 exprimant le canal hERG.....	51
Figure 15 : Systèmes de patch clamp automatiques.....	52
Figure 16 : Exemple de potentiel d'action du Sotalol.....	53
Figure 17 : Modèle Langendorff sur cœur isolé de cobaye.....	54
Figure 18 : Principe de la télémétrie chez le chien.....	55
Figure 19 : Etude de la dP/dtmax en fonction de la fraction d'éjection.....	60
Figure 20 : Illustration schématique du cœur virtuel en tant que plateforme d'évaluation de la sécurité des médicaments.....	62
Figure 21 : Obtention des hiPSCs-CM à partir de fibroblastes humains.....	63
Figure 22 : Etudes de pharmacologie de sécurité exploratoires et réglementaires pour la sélection et le développement de médicaments.....	68
Figure 23 : Détermination de l'index thérapeutique dans le développement d'un médicament.....	70

Tableau 1 : Prévalence des toxicités cardiovasculaires et hépatiques en phase clinique et préclinique.....	16
Tableau 2 : Liste non exhaustive de médicaments susceptibles d'allonger l'intervalle QT	28
Tableau 3 : Les différents mécanismes des molécules à l'origine d'ischémies myocardiques	30
Tableau 4 : Molécules non cardiaques connues pour induire ou aggraver des insuffisances cardiaques et mécanismes associés.	32
Tableau 5 : Exemples de médicaments induisant une augmentation de la pression artérielle	33
Tableau 6 : Toxicité cardiaque induite par les agents anticancéreux	35
Tableau 7 : Exemples de cibles étudiées dans les études de « binding » et leur(s) impact(s) physiologique(s) cardiovasculaire(s).....	48
Tableau 8 : Comparaison d'efficacité entre la troponine et d'autres biomarqueurs de souffrance cardiaque	59
Tableau 9 : Méthodes d'évaluation préclinique de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments et paramètres mesurés.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 10 : Expression des canaux ioniques dans les hiPSC-CMs	64

I) La toxicité cardiovasculaire, aspect clinique et impact sur la santé humaine

Des enquêtes réalisées au sein d'industries pharmaceutiques ont révélé que depuis plus de 10 ans, le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché a fortement diminué et ce, malgré des investissements importants en Recherche et Développement (Munos, 2009). Dans le même temps, la sécurité des produits (évaluée au moyen d'une balance bénéfique/risque qui doit être le plus favorable possible) s'est révélée être une cause majeure de leur attrition lors des phases de développement préclinique et clinique, ou après leur mise sur le marché. Ainsi, un tiers des molécules retirées du marché l'a été à la suite de problèmes de sécurité (Figure 1; Kennedy 1997; Lasser *et al.*, 2002; Kola & Landis 2004; Shah, 2006; Redfern *et al.*, 2003).

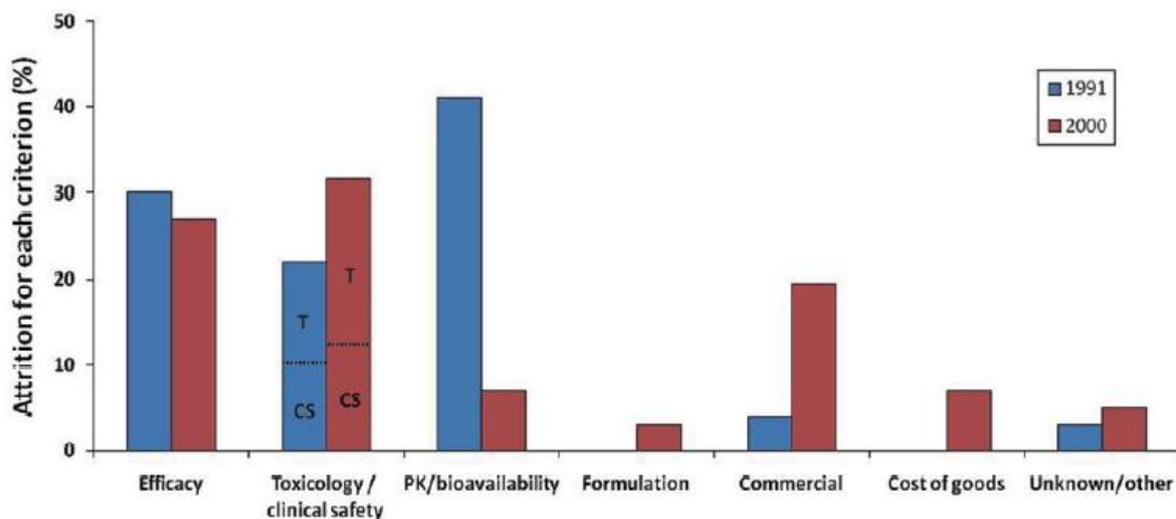


Figure 1 : Causes d'attrition des molécules en développement en 1991 et 2000

En 1991, les principales causes d'attrition étaient les problèmes liés à l'efficacité et la pharmacocinétique des molécules, tandis qu'en 2000, les principales causes d'attrition sont devenues les problèmes liés à l'efficacité et à la sécurité des molécules (Lavery *et al.*, 2011).

Des études ont montré que la toxicité cardiovasculaire est une des raisons principales à l'origine d'effets indésirables médicamenteux et d'attrition des produits en phase de développement préclinique et clinique, ainsi qu'en post-AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) (Tableau 1; Redfern *et al.*, 2010).

Pour preuve, de 1975 à 1999, 45 molécules se sont vues attribuer des « black box warning » qui sont des avertissements à encadré noir alertant que la sécurité du produit n'est pas avérée sur certains points. Ces « black box warning » étaient en relation avec des effets cardiovasculaires qui n'étaient pas présents lors de la commercialisation de ces 45 molécules (ex : ketoconazole, cyclosporine). Par ailleurs, 16 autres molécules ont été retirées du marché à la suite d'évènements cardiovasculaires (ex : terfénaire, astémizole) (Bajracharya *et al*, 2015).

Tableau 1 : Prévalence des toxicités cardiovasculaires et hépatiques en phase clinique et préclinique

Phase	Non-clinical	Phase I	Phase I-III	Phase III/ post-approval	Post-approval	Post-approval	Post-approval
Information	Causes of attrition	Serious ADRs	Causes of attrition	ADRs on label	Serious ADRs	Withdrawal from sale	Withdrawal from sale
Source	Car (2006)	Sibille <i>et al.</i> (1998)	Olson <i>et al.</i> (2000)	BioPrint® (2006)	Budnitz <i>et al.</i> (2006)	Fung <i>et al.</i> , (2001)	Stevens & Baker (2009)
Sample size	88 CDs stopped	1,015 subjects	82 CDs stopped	1,138 drugs	21,298 patients	121 drugs	47 drugs
Cardiovascular	27%	9%	21%	36%	15%	9%	45%
Hepatotoxicity	8%	7%	21%	13%	0%	26%	32%

*La prévalence de la toxicité cardiovasculaire est supérieure à l'hépatotoxicité dans le développement des molécules et en post-AMM (Lavery *et al.*, 2011).*

En ce qui concerne les études cliniques, il apparaît que les études de phase I sont sûres en termes de toxicité cardiovasculaire. Cela souligne ainsi l'efficacité des études réalisées au préalable en préclinique qui permettent d'éliminer les molécules à haut risque cardiovasculaire avant l'entrée en phase clinique. Néanmoins, des préoccupations persistent quant à l'identification d'évènements cardiovasculaires complexes mais graves qui ne peuvent être détectés avant les essais cliniques. Des préoccupations similaires apparaissent également pour les évènements cardiovasculaires qui ne sont pas considérés comme biologiquement significatifs ou qui ne se développent qu'à la suite d'une administration chronique du produit chez une large population de patients (Redfern *et al.*, 2010; Joy & Hegele, 2008; Paul *et al.*, 2010; Lewington *et al.*, 2002). Ces effets indésirables cardiovasculaires se dévoilent ainsi tardivement, lors des essais cliniques, et peuvent conduire à des restrictions d'utilisation, un suivi pré ou post AMM, voire un arrêt de la molécule.

Il est important de considérer que la toxicité cardiovasculaire peut être observée pour des produits à visée cardiovasculaire mais également pour des produits à visée non cardiovasculaire, et que l'ensemble des composants du système cardiovasculaire (cœur et vaisseaux sanguins) peut être impacté. Ces effets peuvent être de nature fonctionnelle et/ou structurelle, faisant suite à une administration aiguë (dose unique) ou répétée.

Ainsi, dans un contexte où les exigences réglementaires s'imposent de plus en plus aux industries pharmaceutiques, il est nécessaire de développer des molécules présentant un profil cardiovasculaire satisfaisant en clinique. Cela est d'autant plus important que, contrairement aux essais cliniques où les patients sont traités en monothérapie, la population traitée par un médicament après sa commercialisation est bien souvent polymédicamentée, ce qui favorise les interactions médicamenteuses pouvant générer ou majorer un effet indésirable cardiovasculaire. Par ailleurs, certains patients peuvent présenter des facteurs de risque cardiovasculaires préexistants (diabète, obésité, tabagisme, hypertension artérielle) qui impactent leur prise en charge ; les traitements utilisés chez ces personnes doivent être exempts d'effets indésirables cardiovasculaires. Du fait de l'importante incidence et de la sévérité des complications cardiovasculaires induites par les médicaments, la sécurité cardiovasculaire constitue une préoccupation majeure dans le développement de ces produits.

La sécurité non clinique cardiovasculaire des candidats médicaments est évaluée au moyen d'études de toxicologie et de pharmacologie de sécurité visant à caractériser la toxicité cardiovasculaire des produits, et notamment les organes cibles, les effets dose/réponse, le niveau de dose sans effet indésirable observé (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) ainsi que la réversibilité des effets. Afin d'assurer un meilleur profil de sécurité cardiovasculaire des molécules, les agences européennes, américaines et japonaises ont élaboré des textes réglementaires et des recommandations ICH (International Conference of Harmonization) axés sur l'évaluation du risque cardiovasculaire des produits. Ainsi, les études de sécurité non-clinique, médiées dans un premier temps par la ligne directrice ICH M3, ont pour objectif de déterminer la première dose à administrer à l'homme en phase clinique et d'identifier les effets indésirables cardiovasculaires qui devront nécessiter une surveillance particulière.

Dans les années 2000, la pharmacologie de sécurité est devenue une discipline à part entière avec la rédaction des lignes directrices ICH S7A et ICH S7B relatives à l'impact fonctionnel des produits en phase préclinique. Ces textes réglementaires préconisent la réalisation d'études précliniques d'évaluation du risque cardiovasculaire afin d'établir le profil de sécurité cardiovasculaire des produits. Nous verrons que les modèles utilisés, à la fois *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, sont intégrés dans des stratégies d'évaluation précoces du risque cardiovasculaire mises en place par les laboratoires pharmaceutiques avec pour objectif d'augmenter la sécurité pour les patients en phase clinique, de favoriser la mise sur le marché de nouvelles substances et de diminuer le temps et les coûts de développement.

II) Mécanismes de toxicités cardiovasculaires induites par les médicaments

1) *Rappel : anatomie et physiologie cardiaques*

a) Le cœur

Le cœur est un organe vital principalement constitué d'un muscle, le myocarde, dont les cellules (les cardiomyocytes) possèdent la propriété de se contracter spontanément de manière automatique et indépendante sous l'influence du système nerveux autonome. Le myocarde est intérieurement tapissé par l'endocarde et est entouré d'un sac « séreux » appelé le péricarde. Le cœur est divisé en 4 cavités : l'oreillette et le ventricule droit ainsi que l'oreillette et le ventricule gauche. Les cavités droites et gauches sont totalement séparées entre elles par le septum. Les oreillettes et les ventricules sont séparés par des valvules empêchant le sang de refluer du ventricule vers l'oreillette (Declerck, 1997). Le cœur va ainsi jouer le rôle de pompe physiologique en distribuant le sang aux divers organes.

Ainsi, les parties droites du cœur assurent la circulation du sang veineux qui arrive de la veine cave, passe par l'oreillette puis le ventricule droit pour être éjecté dans l'artère pulmonaire. Les parties gauches assurent, quant à elles, la circulation du sang artériel qui arrive des veines pulmonaires, traverse l'oreillette puis le ventricule gauche pour être éjecté par l'artère aorte (Figure 2) (Declerck, 1997).

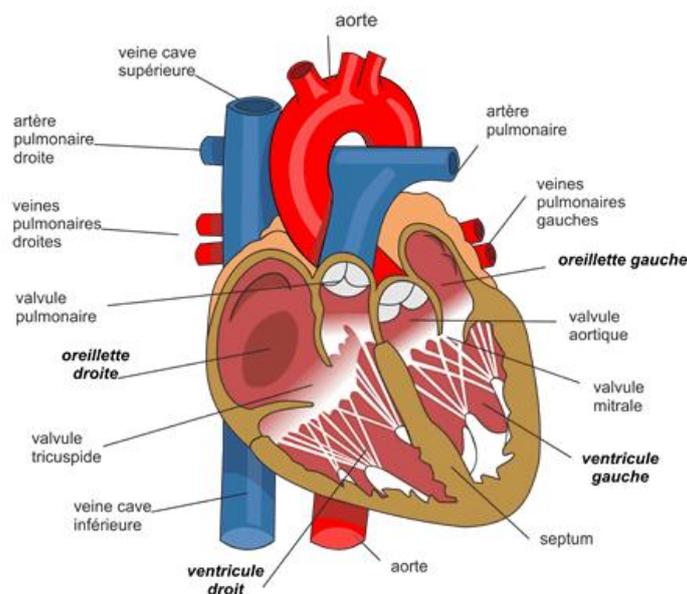


Figure 2 : Anatomie du cœur

Au sein de la partie droite du cœur, le nœud sinusal est doté d'un automatisme faisant naître une onde de dépolarisation qui va se propager dans l'ensemble de la structure cardiaque. Cette onde est à l'origine de l'activité électrique et de la contraction cardiaque (ou systole) qui va expulser le sang des oreillettes vers les ventricules puis vers les artères. Cette contraction est suivie par la relaxation cardiaque (ou diastole) durant laquelle le sang s'accumule dans les oreillettes jusqu'au déclenchement d'une nouvelle contraction. Cet enchaînement de contractions et de relaxations cardiaques constitue le cycle cardiaque.

En raison de son rôle physiologique majeur, le système cardiovasculaire peut, s'il est altéré par un médicament, être à l'origine d'effets indésirables capables de mettre en jeu le pronostic vital du patient. Par ailleurs, du fait de l'abondance de mitochondries dans les cellules cardiaques ainsi que de la relation étroite entre le métabolisme oxydatif et la fonctionnalité du myocarde, il semblerait que des altérations mitochondriales soient généralement impliquées dans la cardiotoxicité des molécules. On distingue trois catégories de toxicités cardiaques induites par les médicaments : les altérations structurelles, les altérations fonctionnelles et les altérations de l'homéostasie cellulaire ou tissulaire non associées à des dommages structurels et fonctionnels (Bajracharya *et al.*, 2015). De ces différents mécanismes découlent diverses toxicités cardiovasculaires qui seront décrites dans ce chapitre II) ultérieurement.

b) Activité électrique cardiaque

Le muscle cardiaque est soumis à une activité électrique importante qui est régulée en partie par des canaux ioniques transmembranaires voltage dépendants présents à la surface des cellules cardiaques. En fonction du potentiel de membrane des cellules, ces canaux vont pouvoir se présenter sous différents états de conformation.

En conformation ouverte, ils permettent un passage sélectif d'ions dont les variations de concentrations intracellulaires et extracellulaires sont à l'origine de la formation d'un courant électrique. Les variations de voltage engendrées par l'activation et l'inactivation des différents courants ioniques cardiaques sont à l'origine d'un phénomène électrique appelé potentiel d'action (ventriculaire ou auriculaire) (Figure 3).

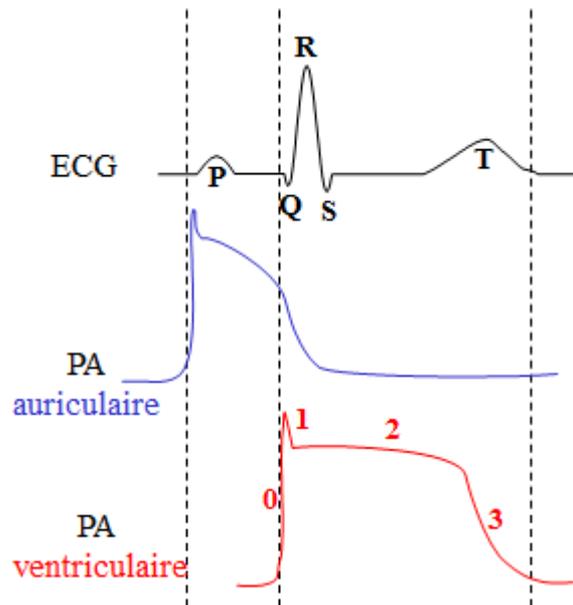


Figure 3 : Relation entre ECG et potentiels d'action cardiaques

PA = potentiel d'action

L'électrocardiogramme (ECG) est la résultante de cette activité électrique issue de l'ensemble des cellules cardiaques qui permet de visualiser les changements de potentiel électrique cardiaque en fonction du temps. Un ECG est composé de plusieurs éléments :

- L'onde P correspond à la dépolarisation auriculaire.
- L'intervalle PR correspond au temps de conduction auriculo-ventriculaire.
- Le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules.
- Le segment ST isoélectrique correspond à la phase de dépolarisation complète des ventricules.
- L'intervalle QT correspond à la durée entre le début de la dépolarisation jusqu'à la fin de la repolarisation ventriculaire.
- L'onde T correspond à la repolarisation ventriculaire.

Ainsi, toute perturbation des courants ioniques cardiaques ayant un impact sur le potentiel d'action électrique se traduira par une modification de l'ECG et de la durée de ses différents intervalles.

c) Les vaisseaux sanguins

L'organisme est constitué de vaisseaux sanguins (artères, veines et capillaires) qui assurent la circulation du sang. Les artères distribuent le sang à haute pression aux différents tissus et organes. Elles sont constituées de fibres musculaires lisses capables de se contracter et de se relaxer afin de s'adapter aux importantes variations de pression engendrées par l'activité cardiaque. Les veines permettent de ramener le sang au cœur. Et sont également constituées de parois élastiques afin de pouvoir répondre aux variations de pression. Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins du corps. Ils sont en étroite relation avec les organes et les tissus pour en assurer l'apport en oxygène et en nutriments.

De manière plus précise, le système cardiovasculaire est constitué de deux types de circulation :

- La circulation systémique (ou « grande circulation ») où le sang circule à haute pression afin d'irriguer l'ensemble des organes. Elle se compose du ventricule gauche, de l'aorte, des capillaires tissulaires et organiques, des veines caves et de l'oreillette droite.
- La circulation pulmonaire (ou « petite circulation ») où le sang circule à basse pression. Elle se compose du ventricule droit, de l'artère pulmonaire, des capillaires pulmonaires, des veines pulmonaires et de l'oreillette gauche.

d) Régulation par le système nerveux autonome

Le cœur et les vaisseaux sanguins sont sous le contrôle du système nerveux autonome (ou système nerveux végétatif) impliqué dans les fonctions involontaires de l'organisme. Il permet de réguler les fonctions des organes en fonction des besoins de l'organisme. Le système nerveux autonome va donc avoir un rôle majeur dans la contraction/relaxation des muscles lisses vasculaires ainsi que dans l'activité cardiaque.

Le système nerveux autonome est divisé en deux systèmes antagonistes : le système sympathique et le système parasympathique dont les voies nerveuses sont constituées de deux neurones successifs (un neurone préganglionnaire et un neurone postganglionnaire) et d'un ganglion qui assure la liaison entre ces deux neurones (Figure 4). Les neurotransmetteurs qui vont stimuler ces voies sont la noradrénaline et l'acétylcholine. Ainsi, une stimulation du système sympathique va être à l'origine d'une tachycardie, d'un effet inotrope positif et d'une vasodilatation des fibres vasculaires lisses.

A contrario, une stimulation du système parasympathique va entraîner une bradycardie et une vasoconstriction des fibres vasculaires lisses.

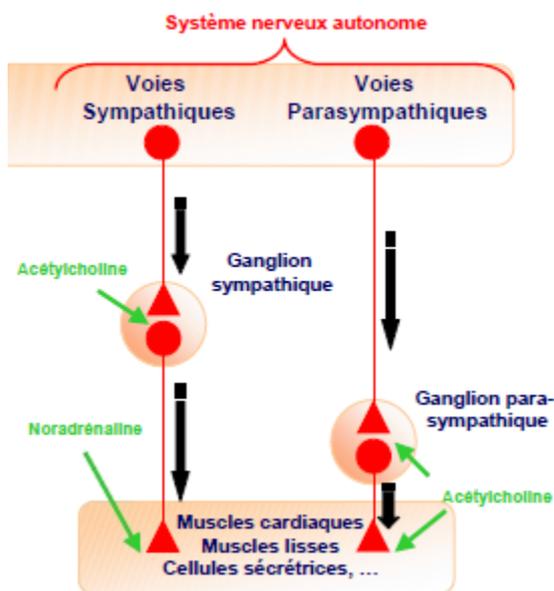


Figure 4 : Schéma du système nerveux autonome

Les voies sympathiques et parasympathiques sont composées d'un neurone pré-ganglionnaire et d'un neurone post-ganglionnaire stimulés par la noradrénaline et l'acétylcholine.

2) Arythmies

Les arythmies constituent la première cause de toxicité cardiaque d'origine iatrogène, c'est pourquoi une attention particulière est accordée à leur évaluation et à leur détection.

a) Activité électrique cardiaque

Les arythmies cardiaques se caractérisent par un (ou plusieurs) trouble(s) de la conduction cardiaque pouvant conduire à diverses manifestations cliniques (bradycardie, tachycardie, torsade de pointe, bloc auriculo-ventriculaire, etc.).

D'un point de vue électrique, le potentiel d'action ventriculaire sera davantage développé dans ce chapitre en raison de son implication dans la genèse des arythmies ventriculaires.

Parmi les canaux ioniques cardiaques à l'origine du potentiel d'action ventriculaire, trois sont fréquemment impliqués dans les phénomènes d'arythmies (Amuzescu *et al.*, 2014) :

- Le canal hERG (*Human Ether a go go Related Gene*) responsable du courant I_{Kr} .
- Le canal NaV1.5 responsable du courant I_{Na} .
- Le canal CaV1.2 responsable du courant I_{Ca} .

Comme nous l'avons vu antérieurement, les variations de voltage engendrées par la fermeture et l'ouverture de ces différents canaux ioniques cardiaques sont à l'origine d'un phénomène électrique appelé potentiel d'action ventriculaire (Figure 5).

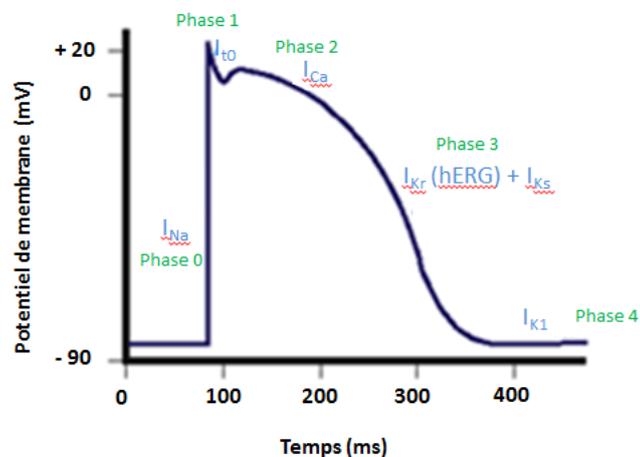


Figure 5 : Potentiel d'action ventriculaire cardiaque

Phase 0 : dépolarisation rapide méditée par le courant sodique entrant I_{Na}

Phase 1 : repolarisation initiale partielle méditée par le courant potassique transitoire sortant I_{t0} vers un potentiel proche de 0 mV.

Phase 2 : plateau résultant d'une balance entre le courant calcique entrant I_{Ca} et les courants potassiques sortants I_{Kr} à composante rapide et I_{Ks} à composante lente.

Phase 3 : repolarisation rapide méditée par la fermeture des canaux calciques et l'ouverture toujours maintenue des canaux potassiques responsables des courants sortants I_{Kr} et I_{Ks} .

Phase 4 : retour au potentiel de repos I_{K1} .

Le potentiel d'action ventriculaire permet ainsi d'avoir une vision intégrée des différents courants entrants et sortants impliqués dans l'activité électrique cardiaque, et qui peuvent donc être à l'origine d'effets arythmiques. Par ailleurs, il est à noter que, parmi les différents intervalles de l'ECG, trois sont particulièrement étudiés dans les arythmies (Figure 6) :

- L'intervalle PR qui correspond au temps de conduction de l'influx électrique du nœud sinusal au nœud auriculo-ventriculaire.
- Le complexe QRS qui est le reflet de la phase de dépolarisation ventriculaire permettant la conduction de l'influx nerveux à travers les ventricules.
- L'intervalle QT qui correspond à la durée entre le début de la dépolarisation jusqu'à la fin de la repolarisation ventriculaire.

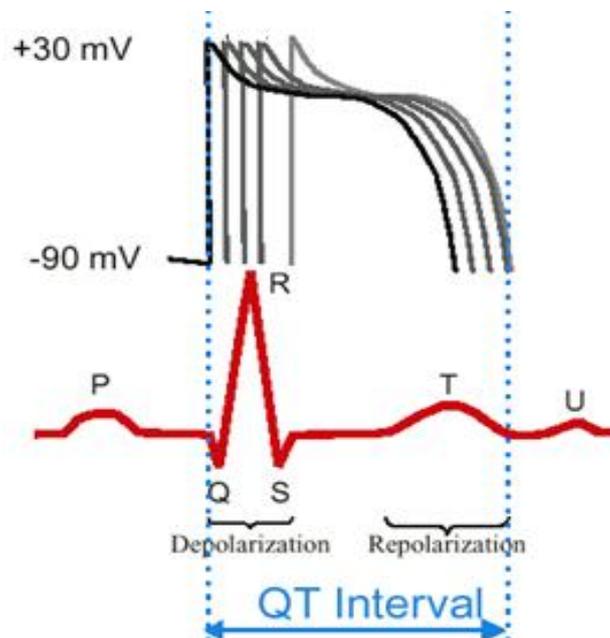


Figure 6 : Relation entre le potentiel d'action et l'ECG

L'intervalle QT correspond à la durée entre le début de la dépolarisation jusqu'à la fin de la repolarisation ventriculaire.

Ainsi en fonction du type de courant(s) cardiaque(s) altéré(s), les médicaments peuvent induire différents types d'arythmies (bradycardie sinusale, bloc auriculo-ventriculaire, fibrillation auriculaire, tachycardie ventriculaire, etc.), mais nous nous focaliserons essentiellement sur les arythmies de type torsades de pointe et fibrillations auriculaires.

a) Les torsades de pointe

Les torsades de pointe sont caractérisées par une tachycardie ventriculaire polymorphique mettant en jeu le pronostic vital du patient. Celle-ci peut régresser de façon spontanée ou dégénérer en fibrillation ventriculaire fatale. A l'échelle de l'ECG, on observe un allongement de l'intervalle QT, suivi d'une succession rapide de complexes QRS qui « tournent » autour de la ligne isoélectrique (Figure 7). La fréquence cardiaque peut s'accélérer de 150 à 200 battements par minute sur une durée de 5 à 20 battements, pouvant ainsi donner lieu à une fibrillation ventriculaire et à une torsade de pointe.

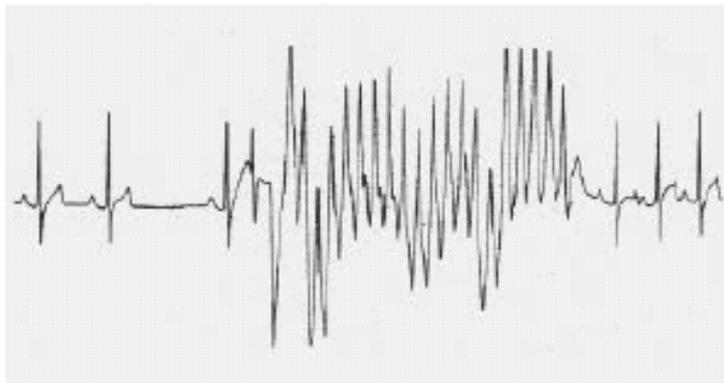


Figure 7 : ECG d'une torsade de pointe réalisé sur un chien présentant une anomalie congénitale.

Succession rapide de complexes QRS qui « tournent » autour de la ligne isoélectrique

Les torsades de pointe sont associées à une prolongation de la durée du potentiel d'action qui peut entraîner la réactivation des canaux calciques et sodiques à l'origine de dépolarisations précoces appelées Early After Depolarization (EAD). Ces EADs vont pouvoir donner naissance à un ou plusieurs potentiel(s) d'action prématuré(s), interrompant ainsi la phase de repolarisation (Figure 8) (Steidl-Nichols, 2014 ; Hondeghem *et al.*, 2001).

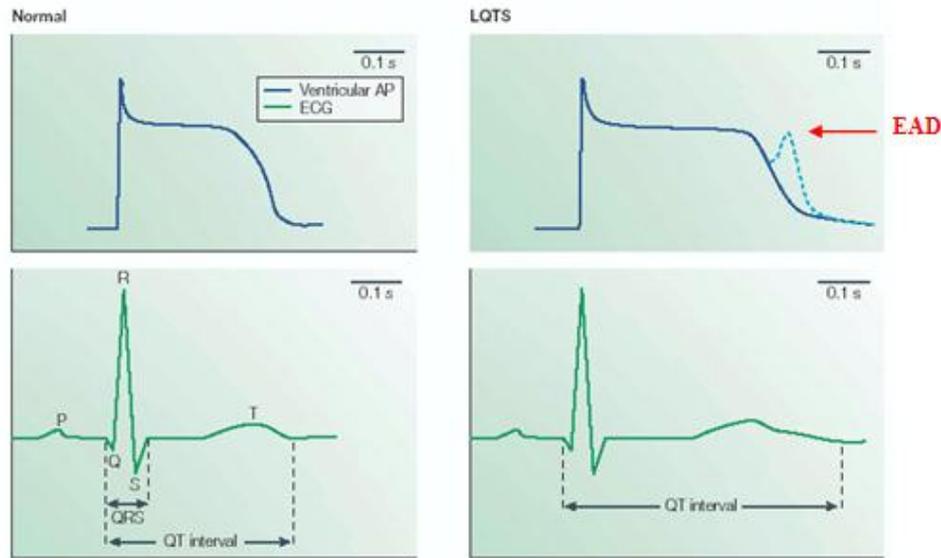


Figure 8 : Relation entre potentiel d'action et intervalle QT de l'ECG en situation physiologique et en situation de prolongation de l'intervalle QT.

L'allongement de l'intervalle QT va favoriser l'apparition d'une dépolarisation précoce (EAD)

La torsade de pointe peut être favorisée par certains facteurs de risque tels que la bradycardie, l'hypokaliémie, le syndrome congénital du QT long (mutation des gènes codant pour les canaux ioniques cardiaques), l'administration de médicaments allongeant l'intervalle QT, des antécédents de pathologies cardiaques et le sexe féminin (Aggarwal *et al.*, 2006).

L'un des mécanismes les plus fréquemment rencontrés lors de ces arythmies de type torsades de pointe induites par les médicaments, implique l'inhibition du canal potassique hERG par la molécule pouvant conduire, en clinique, à l'apparition de torsades de pointes (Trudeau *et al.*, 1995). Néanmoins, d'autres canaux cardiaques, notamment calciques et sodiques peuvent jouer un rôle dans la genèse de ces arythmies.

Entre 1990 et 2001, huit molécules à visée non cardiovasculaire ont été retirées du marché du fait de leur capacité à induire un retard à la repolarisation et un allongement de l'intervalle QT à l'origine de torsades de pointe. C'est le cas notamment de la Terfénadine, un antihistaminique non-sédatif qui a été retiré du marché en 1997 à la suite de plusieurs cas de torsades de pointe observées à des doses suprathérapeutiques ou en co-administration avec des inhibiteurs enzymatiques (kétocoazole).

Plus récemment, l'antiémétique Dompéridone (MOTILIUM®) a fait l'objet de nouvelles restrictions afin de minimiser les risques cardiaques, notamment d'arythmies ventriculaires liées à un allongement de l'intervalle QT de l'ECG. Ainsi, on estime actuellement qu'une cinquantaine de molécules sont capables d'allonger l'intervalle QT et/ou de provoquer des torsades de pointe (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste non exhaustive de médicaments susceptibles d'allonger l'intervalle QT
(Bajracharya et al, 2015)

Classe thérapeutique	Molécules
Anticancéreux	Lapatinib, nilotinib, vorinostat
Antiémétiques	Cisapride, dompéridone, dolasétron, ondansétron
Anesthésiques	Cocaïne, sevoflurane, droperidol
Anti-infectieux	Azithromycine, atazanavir, ciprofloxacine, chloroquine, érythromycine, fluconazole, kétoconazole, moxifloxacine, norfloxacine, ritonavir, saquinavir, sulfaméthoxazole
Antihistaminiques	Astemizole, ebastine, clemastine, hydroxyzine, terféndine
Immunosuppresseurs	Tacrolimus
Antimigraineux	Naratriptan, sumatriptan, zolmitriptan
Myorelaxant	Tizanidine

a) Fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire est un trouble du rythme chronique caractérisé par une activation non coordonnée des cellules myocardiques auriculaires, avec pour conséquence une altération de la fonction mécanique auriculaire. Les symptômes associés ne sont pas spécifiques et comprennent une dyspnée, une fatigue, des palpitations ainsi qu'une gêne thoracique. Il s'agit d'un évènement cardiaque fréquent chez les sujets âgés ou porteurs de cardiopathies. La prévalence de la fibrillation auriculaire dans la population est estimée à 0,5 % à l'âge de 50-59 ans et atteint 10 % après l'âge de 80 ans. La fibrillation auriculaire peut être responsable de symptômes gênants et de complications graves (hémodynamiques et thrombo-emboliques) comme notamment des accidents vasculaires cérébraux.

Plusieurs classes thérapeutiques peuvent induire des fibrillations auriculaires iatrogènes via différents mécanismes (Tamargo et al., 2012).

Ainsi, les sympathomimétiques, parasympathomimétiques et la théophylline exercent un effet électrophysiologique direct tel qu'un raccourcissement de la durée du potentiel d'action ou un ralentissement de la conduction cardiaque. D'autres mécanismes tels que des déséquilibres électrolytiques (diurétiques, glucocorticoïdes), une libération de cytokines (IL-2) ou une augmentation du stress oxydatif (chimiothérapies) sont également impliqués dans l'apparition de fibrillations auriculaires.

3) *Ischémie myocardique et syndrome coronarien aigu (SCA)*

L'ischémie myocardique se définit par une diminution du flux sanguin artériel vers le myocarde, entraînant ainsi une diminution de son oxygénation. Le mécanisme impliqué résulte d'un déséquilibre transitoire entre les apports et les besoins en oxygène du myocarde. Ces ischémies sont généralement observées chez des patients atteints de pathologies coronariennes athérosclérotiques se caractérisant par un rétrécissement des artères coronaires. Ainsi une ischémie myocardique peut entraîner l'apparition d'un SCA qui se définit par un infarctus du myocarde associé à une élévation du segment ST, un infarctus du myocarde non associé à une élévation du segment ST ou un angor instable.

Il est établi que plusieurs médicaments peuvent être à l'origine d'ischémies myocardiques ou de SCA, notamment chez des patients dont le profil coronarien était normal avant traitement (Ottervanger *et al.*, 1997). Ces effets peuvent être associés à des traitements à court terme et à long terme.

En conditions physiologiques, il existe une relation linéaire entre la demande et la consommation du cœur en oxygène, ainsi que le flux coronarien. Cet équilibre est maintenu par un ajustement réalisé à chaque battement cardiaque. Lors d'une ischémie cardiaque, un déséquilibre est observé entre ces trois composants, la demande en oxygène devenant ainsi supérieure aux réserves. Trois facteurs sont à l'origine de l'augmentation de la demande en oxygène : la fréquence cardiaque, la contractilité cardiaque et la tension ventriculaire systolique gauche (Ardehall *et al.*, 1990). Ainsi, des molécules impactant l'un de ces facteurs sont susceptibles de provoquer une ischémie myocardique (Tableau 3).

Tableau 3 : Les différents mécanismes des molécules à l'origine d'ischémies myocardiques
(Bajracharya et al, 2015)

Mécanismes	Exemples
Augmentation de la demande en oxygène	
Par effet direct sur le myocarde	Agonistes β -adrénergiques (adrénaline, dopamine), sympathomimétiques (éphédrine, dobutamine)
Par effet indirect sur la pression artérielle (vasodilatation)	Vasodilatateurs (nifédipine, hydralazine)
Par augmentation de la tension systolique ventriculaire gauche (vasoconstriction)	Amphétamines, anti-histaminiques, caféine, pseudoéphédrine
Diminution des réserves du myocarde en oxygène	
Par augmentation des résistances périphériques vasculaires (vasospasmes, thromboses)	Cocaïne, agents anti migraineux (dérivés de l'ergot, triptans)
Par diminution de la perfusion coronarienne diastolique	Enalapril, nifédipine, adenosine, hydralazine

C'est le cas par exemple lors d'un arrêt brutal d'un traitement par bêta-bloquants qui va entraîner une augmentation de la fréquence cardiaque, ou encore l'administration de molécules hypotensives (ex : nifédipine) qui vont augmenter indirectement la fréquence cardiaque par stimulation de barorécepteurs.

Les facteurs diminuant les réserves en oxygène du myocarde peuvent aggraver une ischémie myocardique. Les facteurs déterminant de cette réserve en oxygène sont l'augmentation de l'activation plaquettaire, les thromboses coronariennes, la capacité du sang à transporter l'oxygène et le flux coronarien, ce dernier étant considéré comme le plus important d'un point de vue clinique.

Les artères coronaires approvisionnant le myocarde en oxygène, une diminution du flux coronarien par formation d'une plaque d'athérome peut entraîner des phénomènes ischémiques. Des modifications de l'ECG peuvent être observées lorsque le flux sanguin devient insuffisant dans une région du cœur. Une augmentation du segment ST est ainsi généralement observée lors d'ischémies aiguës, suggérant ainsi une souffrance myocardique.

4) *Insuffisances cardiaques*

Les insuffisances cardiaques se définissent comme une incapacité du cœur à fournir en toute circonstance un débit sanguin suffisant et adapté pour assurer les besoins des différents tissus et organes, notamment en matière d'oxygène et de nutriments (Ardehall *et al.*, 1990). Ce phénomène survient lors d'altération de la phase de remplissage (diastolique avec une Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche (FEVG) normale) ou d'éjection (systolique avec une FEVG < 40 %) du ventricule gauche. Dans un premier temps, le cœur va compenser ce défaut d'oxygénation des tissus et des organes en battant plus vite et plus fort, ce qui va entraîner une hypertrophie ventriculaire gauche. Puis, dans un second temps, un phénomène de décompensation va apparaître avec un dysfonctionnement du ventricule gauche.

Les symptômes incluent une importante asthénie, des dyspnées, voire des œdèmes des membres inférieurs qui sont le résultat d'une mauvaise perfusion tissulaire, d'une congestion veineuse et d'un déséquilibre dans la balance eau-électrolytes. Certaines conditions pathologiques, telles qu'une hypertension, une valvulopathie ou une maladie coronarienne, peuvent être à l'origine d'une insuffisance cardiaque aujourd'hui considérée comme une cause importante de morbi-mortalité dans les pays développés (on estime que 55 000 patients décèdent aux Etats-Unis chaque année à la suite d'insuffisance cardiaque).

L'origine des insuffisances cardiaques peut également être iatrogène, avec certains médicaments qui peuvent induire ce type de cardiotoxicité par différents mécanismes (Tableau 4). Ils peuvent diminuer la contractilité myocardique (ex : anthracyclines), augmenter la précharge (ex : inhibiteurs COX2 et glitazones) ou altérer les valves cardiaques (ex : antimigraineux et anorexigènes).

Tableau 4 : Molécules non cardiaques connues pour induire ou aggraver des insuffisances cardiaques et mécanismes associés
(Bajracharya *et al.*, 2015)

Type de problème cardiaque	Médicament
Cardiomyopathies	Anthracyclines (doxorubicine), trastuzumab, interleukine-2, etanercept
Altération des valves cardiaques	Antimigraineux (ergotamine, méthysergide), anorexigènes (fenfluramine)
Augmentation de la précharge	AINS (rofécoxib, célécoxib), antidiabétiques (rosiglitazone, pioglitazone)

5) ***Impacts sur la pression artérielle***

Il est établi que de nombreux médicaments sont capables d'impacter de manière directe ou indirecte la pression artérielle, engendrant ainsi des hypotensions ou des hypertensions.

a) Hypertension

L'hypertension artérielle est définie par une pression artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mm de Hg, et/ou une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mm de Hg. Il existe des facteurs aggravants de l'hypertension artérielle, notamment le tabac, le diabète, les dyslipidémies, l'alcool, l'obésité ou encore la sédentarité.

De nombreux médicaments sont susceptibles d'entraîner une augmentation de la pression artérielle via divers mécanismes incluant une rétention hydro-sodée, une activation du système nerveux sympathique ou encore une inhibition du système VEGF ou une inhibition des prostacyclines (Grossman *et al.*, 2012 ; White *et al.*, 2007a; Mourad *et al.*, 2011) (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemples de médicaments induisant une augmentation de la pression artérielle

Classe thérapeutique	Molécules	Mécanisme d'action
Anticancéreux	Sorafenib, sunitinib, bevcizumab, cediranib	Inhibition du VEGF et augmentation des résistances vasculaires
Antidépresseurs	Venlafaxine, bupropion,	Activation du système nerveux sympathique (inhibition de la recapture de sérotonine)
Immunosuppresseurs	Cyclosporine, tacrolimus	Vasoconstriction rénale et périphérique, production d'endotheline-1, activation du système nerveux sympathique
AINS et analgésiques	Célécoxib, ibuprofène, kétoprofène, piroxicam, étoricoxib	Inhibition prostaglandines, augmentation du volume plasmatique
AIS	Hydrocortisone, bétaméthasone, prednisone	Rétention hydro-sodée
Agents stimulants et anorexigènes	Amphétamine, atomoxétine, méthylphénidate	Stimulation des récepteurs β -1 et α -1
Sympathomimétiques	Epinéphrine, pseudoéphédrine, amphétamine, cocaïne	Stimulation récepteurs β cardiaques et des récepteurs α vasculaires

Une augmentation modérée, voire sévère, de la pression artérielle est généralement associée à une altération fonctionnelle de certains organes tels que le cœur ou le rein (Textor *et al.*, 2000; Hoorn *et al.*, 2012). Ainsi, une élévation de la pression artérielle est corrélée avec le risque d'évènements cardiovasculaires. Cela a été démontré avec l'ibuprofène et le rofécoxib, deux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) associés à une augmentation de la pression artérielle systolique en clinique (3-6 mm de Hg) et à une augmentation d'évènements cardiovasculaires tels que des insuffisances cardiaques ou des accidents vasculaires cérébraux (Bombardier *et al.*, 2000 ; White *et al.*, 2007b ; Bresalier *et al.*, 2005). Ainsi, en traitant l'hypertension artérielle, on diminue le risque d'apparition de tels évènements cardiovasculaires (VA Cooperative Research Group, 1970 ; SHEP Cooperative Research Group, 1991).

Par ailleurs, une légère augmentation de la pression artérielle induite par les molécules constitue une préoccupation au sein d'une population présentant des facteurs de risque cardiovasculaires préexistants (diabète, obésité, tabagisme). C'est pourquoi, lors du développement d'une molécule potentiellement hypertensive, il est important de considérer l'indication thérapeutique (agent anticancéreux vs analgésique), la population cible (jeune vs âgée), la durée du traitement, la réversibilité de l'effet ainsi que la possibilité de le contrer par co-administration d'une molécule antihypertensive (Sager *et al.*, 2013).

b) Hypotension

L'hypotension orthostatique se définit comme une diminution de la pression artérielle systolique ou diastolique respectivement de 20 ou 10 mm Hg, dans les trois minutes qui suivent un changement de position assise ou allongée à debout (Freeman *et al.*, 2011). En situation normale, les changements posturaux sont compensés par le système nerveux sympathique. Mais lorsque ce dernier est altéré, une diminution de la perfusion cérébrale est observée et les patients sujets à des hypotensions orthostatiques peuvent présenter des étourdissements, voire une perte de connaissance (Bhatt *et al.*, 2015). Cet effet est détecté tardivement dans le développement des produits du fait du peu de modèles précliniques capables de détecter les altérations du système sympathique et les hypotensions orthostatiques (Picard *et al.*, 2011).

De nombreuses molécules sont susceptibles d'entraîner une hypotension orthostatique suite à leur administration, telles que les antipsychotiques, les antagonistes α 1-adrénergiques utilisés dans l'hypertrophie bénigne de la prostate ainsi que les vasodilatateurs et autres molécules anti-hypertensives (Arnold & Shibao, 2013; Fine & Ginsberg, 2008; Leung *et al.*, 2012). Ce risque est d'autant plus élevé chez les personnes âgées qui sont plus sensibles à ce type d'effet indésirable cardiovasculaire (Kamaruzzaman *et al.*, 2010).

6) Cas particulier de la toxicité cardiovasculaire des anticancéreux

La toxicité cardiovasculaire est une complication à court ou long terme des thérapies anticancéreuses (chimiothérapies classiques et thérapies ciblées) impliquant le cœur, la fonction endothéliale et les flux hémodynamiques. Par ailleurs, beaucoup des patients sous traitement anticancéreux présentent des facteurs de risque favorisant la survenue de pathologies cardiovasculaires, notamment le tabac, le diabète, la consommation d'alcool ou encore l'obésité. Cette préexistence de facteurs de risque cardiovasculaires chez les patients atteints de cancer restreint de manière considérable le diagnostic et la mise en place de thérapies anticancéreuses.

C'est pourquoi une bonne connaissance de la toxicité cardiovasculaire des molécules oncologiques est essentielle afin d'assurer la mise en place d'un traitement adapté au patient en fonction de son état physiopathologique. La toxicité cardiovasculaire de ces produits peut se manifester de façon aiguë, subaiguë ou chronique et peut être réversible (due à un dysfonctionnement cellulaire lié à une altération mitochondriale ou protéique) ou irréversible (due à une mort cellulaire). Différents types de toxicités cardiovasculaires ont ainsi été décrits pour ces molécules : des dysfonctions ventriculaires gauches (diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche), des ischémies cardiaques, des hypertensions, des allongements de l'intervalle QT et des thromboembolismes veineux (Tableau 6).

Tableau 6 : Toxicité cardiaque induite par les agents anticancéreux

(Esposito et al., 2015)

Molécule	Dose	Toxicité cardiaque	Pourcentage de patients en clinique
Doxorubicine	≥ 450 mg/m ²	Dysfonction ventriculaire gauche	3-12 %
Epirubicine	≥ 900 mg/m ²		0.9-3.3 %
Cyclophosphamide	≥ 100-120 mg/kg	Dysfonction ventriculaire gauche	3-5 %
5-FU	Dose thérapeutique	Ischémie cardiaque	1-68 %
Paclitaxel	Dose thérapeutique	Ischémie cardiaque	< 1-5 %
		Allongement du QT	0.1-31 %
		Dysfonction ventriculaire gauche	5-15 %
Arsenic	Dose thérapeutique	Allongement du QT	26-93 %

a) Dysfonction ventriculaire gauche

La complication la plus fréquente rencontrée à la suite de traitements anticancéreux est le développement de dysfonctions ventriculaires gauches à l'origine d'insuffisances cardiaques. Plusieurs molécules oncologiques peuvent engendrer cette cardiotoxicité, parmi lesquelles les antimétabolites, les alkylants ou encore les anthracyclines. Ainsi, la doxorubicine, l'épirubicine et la daunorubicine présentent une cardiotoxicité importante pouvant être majorée par de nombreux facteurs de risques : l'accumulation de dose, l'administration en bolus, des antécédents d'irradiation, le co-traitement avec d'autres produits cardiotoxiques (paclitaxel, trastuzumab), le sexe féminin et les âges extrêmes (Von Hoff *et al.*, 1979 ; Gianni *et al.*, 2009 ; Grenier *et al.*, 1998).

Le mécanisme principal à l'origine de cette toxicité cardiaque implique la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui vont provoquer des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, résultant en une mort cellulaire des cardiomyocytes (Ewer *et al.*, 2004). Un second mécanisme responsable de ce type de cardiotoxicité impliquerait des cassures double-brin de l'ADN causées par la fixation des anthracyclines sur la topoïsomérase II β des cardiomyocytes. Cela aurait pour conséquence des altérations mitochondriales et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 9) (Rochette *et al.*, 2015).

Outre les anthracyclines, des dysfonctions ventriculaires gauches ont également été recensées pour les agents alkylants, notamment le cyclophosphamide pour lequel 7 à 28 % des patients ont développé une cardiotoxicité (Braverman *et al.*, 1991 ; Goldberg *et al.*, 1986).

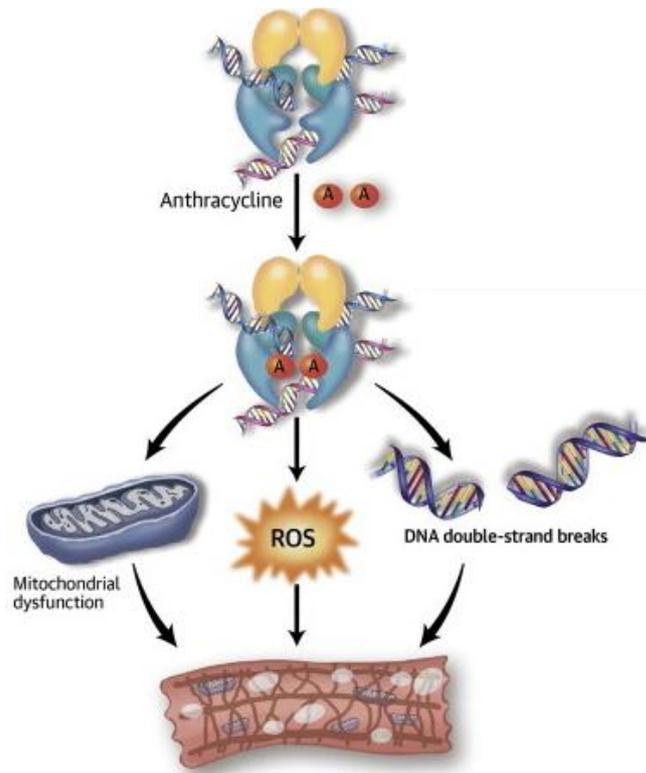


Figure 9 : Mécanismes d'action de la cardiotoxicité des anthracyclines

Les anthracyclines perturbent l'action de la topoisomérase II β ce qui provoque des cassures doubles-brins de l'ADN et entraîne des modifications du transcriptome à l'origine d'altérations mitochondriales et de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Vejpongsa et al., 2014).

b) Ischémie myocardique

Comme décrit précédemment, l'ischémie myocardique consiste en une diminution de l'apport sanguin artériel au cœur, et donc une diminution de son oxygénation. Les agents les plus fréquemment impliqués dans les ischémies cardiaques sont les antimétabolites et les poisons du fuseau. Ainsi, le 5-fluorouracil (5-FU) est souvent associé à l'apparition de syndromes ischémiques pouvant se caractériser, en phase clinique, par de l'angine de poitrine ou, dans le pire des cas, par un infarctus du myocarde (Gradishar *et al.*, 1990). Cette cardiotoxicité apparaît de manière rapide, dans les 2 à 5 jours suivant le début du traitement, et elle est généralement réversible à l'arrêt du traitement. Plusieurs mécanismes seraient impliqués dans la cardiotoxicité du 5-FU dont des thromboses coronariennes, des artérites ou des vasospasmes.

Néanmoins, il semblerait que la capécitabine, un analogue du 5-FU utilisé dans les cancers du sein et gastro-intestinaux, serait moins cardiotoxique que ce dernier (Frickhofen *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont également montré que les inhibiteurs de tyrosine kinase sont associés à une augmentation d'évènements thromboemboliques et d'infarctus du myocarde (Choueiri *et al.*, 2010 ; Schutz *et al.*, 2012). Cela serait dû en partie à leur mécanisme d'action, avec une inhibition de la voie du VEGF empêchant la régénération des cellules endothéliales.

c) Thromboembolismes veineux

Les thromboembolismes veineux constituent l'une des plus importantes causes de morbi-mortalité chez les patients atteints de cancer. C'est pourquoi il est nécessaire d'identifier les facteurs de risque de ces thromboembolismes veineux afin d'anticiper et de mettre en place une éventuelle thérapie thromboprophylaxique. Les molécules connues pour augmenter le risque de thromboembolismes veineux sont les agents antiangiogéniques, la thalidomide, le lénalidomide, le cisplatine et le tamoxifène. Ainsi, sous traitement par la thalidomide en monothérapie, l'incidence de thromboembolismes veineux est estimée à 5 % (Rodeghiero *et al.*, 2003). Mais ce risque augmente lorsque la thalidomide est co-administrée avec la dexaméthasone ou la doxorubicine en absence de thromboprophylaxie. Le lénalidomide, un analogue de la thalidomide, voit son risque de thromboembolismes veineux varier de 3 à 75 % (Hirsch *et al.*, 2007).

Cette toxicité est due à une action directe de ces produits sur les cellules endothéliales et par augmentation de l'agrégation plaquettaire (Yeh & Bickford, 2009). C'est pourquoi, à l'exception de patients présentant des contre-indications ou des saignements importants, il est conseillé de mettre en place une prophylaxie antithrombotique chez les patients hospitalisés lorsque le taux de plaquettes est supérieur à 50 000/ μ L. Le traitement standard d'un épisode de thromboembolisme veineux aigu sera une administration en sous-cutané d'héparine de bas poids moléculaire ou la perfusion en continu d'héparine non-fractionnée.

d) Hypertension

L'hypertension est une possible complication cardiovasculaire des chimiothérapies. Un suivi minutieux de cet effet dès l'initiation du traitement anticancéreux est important pour éviter un stress cardiaque. L'apparition de cet effet dépend de la molécule utilisée, du type de tumeur et des facteurs de risque du patient (âge, comorbidités). Il apparaît que l'hypertension est un évènement indésirable fréquent pour les inhibiteurs du VEGFR. Ainsi, l'incidence des hypertensions associées au bevacizumab et au sorafenib est respectivement de 4 à 35 % et de 17 à 43 % (Miller *et al.*, 2007 & 2005 ; Escudier *et al.*, 2007). Près d'un quart des patients (19-24 %) traités par des inhibiteurs de tyrosine kinase vont développer des hypertensions secondaires (Escudier *et al.*, 2007 ; Rini *et al.*, 2011). Les mécanismes impliqués sont encore peu connus, mais plusieurs hypothèses ont été avancées, notamment un déséquilibre de facteurs neuro-humoraux, une raréfaction vasculaire ou une altération de la balance vasculaire de monoxyde d'azote (Kamba *et al.*, 2007 ; Verheul *et al.*, 2007).

Néanmoins, cette augmentation de la pression artérielle semble être un marqueur de l'activité anti tumorale du produit et donc de son efficacité (Motzer *et al.*, 2007 ; Escudier *et al.*, 2007, Miller *et al.*, 2007). Il est recommandé de débiter un traitement antihypertenseur (inhibiteurs de l'enzyme de conversion, dihydropyridine) dès lors qu'une pré-hypertension est mesurée en présence de facteurs de risque (diabète, obésité) ou lorsqu'un organe est en souffrance (hypertrophie ventriculaire gauche, insuffisance rénale chronique) (Chobanian *et al.*, 2003). Une prise en charge rapide de l'hypertension artérielle semble réduire de manière significative le risque de développer des complications telles qu'une hypertension artérielle maligne ou une leucoencéphalopathie.

III) La pharmacologie de sécurité

1) Naissance de la Pharmacologie de Sécurité et guideline ICH S7A

Depuis 1995, la ligne directrice ICH M3 « Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals » définit les différentes études à mettre en place lors du développement préclinique des candidats médicaments. Ce texte a, par la suite, servi de base pour l'évaluation préclinique des molécules en pharmacologie de sécurité. En effet, en 2001, la pharmacologie de sécurité s'est distinguée de la toxicologie en devenant une discipline à part entière dans l'évaluation non-clinique de la sécurité et du développement des médicaments, notamment au travers de l'évaluation des effets indésirables fonctionnels des molécules. Une ligne directrice spécifique à la pharmacologie de sécurité a ainsi été établie par l'ICH, la ligne directrice ICH S7A « Safety Pharmacology studies for Human Pharmaceuticals ». Cette recommandation décrit les principes généraux de la pharmacologie de sécurité, ses rôles, ses objectifs et ses missions, ainsi que les recommandations concernant les études essentielles à mettre en place.

La pharmacologie de sécurité distingue 3 types d'effets :

- les effets pharmacodynamiques primaires correspondant à l'effet thérapeutique recherché (ex : antipsychotique),
- les effets pharmacodynamiques secondaires correspondant à des effets positifs additionnels à l'effet thérapeutique (ex : un antipsychotique luttant contre les troubles de la mémoire),
- les effets secondaires correspondant aux effets indésirables d'une molécule.

L'objectif principal de la pharmacologie de sécurité est ainsi d'assurer la sécurité des patients lors des essais cliniques en étudiant les effets pharmacodynamiques indésirables potentiels d'une substance sur les trois fonctions vitales majeures de l'organisme, à savoir le système cardiovasculaire, le système nerveux central et le système respiratoire. Ces effets indésirables sont mis en relation avec une exposition se situant dans la marge thérapeutique et au-dessus de celle-ci (Guillon, 2010).

D'un point de vue réglementaire et au moyen de modèles *in vitro* et *in vivo*, ces études ont donc pour buts (ICH S7A, 2001) :

- d'identifier les propriétés pharmacodynamiques indésirables d'une substance pouvant être relevant chez l'homme,
- d'évaluer les effets pharmacodynamiques et/ou physiopathologiques d'une substance observés lors des études toxicologiques et cliniques,
- d'investiguer les mécanismes des effets pharmacodynamiques observés et suspectés.

Les études de pharmacologie de sécurité doivent être conçues de manière rationnelle en tenant compte au préalable de certains facteurs, notamment les effets liés à la classe thérapeutique, les résultats d'études pharmacologiques ou toxicologiques antérieures et les données de liaison à des ligands laissant supposer des effets indésirables potentiels. Ces données sont importantes car les effets indésirables étudiés en pharmacologie de sécurité résultent généralement de l'interaction entre un ligand et un récepteur. C'est pourquoi la guideline ICH S7A préconise d'établir rapidement le profil d'interactions réceptorielles des molécules.

Le choix du modèle animal utilisé doit être pertinent et basé sur des similitudes métaboliques avec l'homme. Dans la mesure du possible, la voie d'administration utilisée doit être la même que celle prévue en phase clinique. Afin de pouvoir définir la relation concentration-effet ou dose-effet d'un effet indésirable observé, il est nécessaire d'effectuer un dosage du produit dans le système d'essai. Durant les études de pharmacologie de sécurité, la molécule est généralement administrée en dose unique.

La ligne directrice ICH S7A décrit la batterie de tests à effectuer pour étudier les effets d'une substance sur les trois fonctions vitales de l'organisme. Cette batterie de base est appelée « Core battery » dans la ligne directrice ICH S7A (Figure 10).

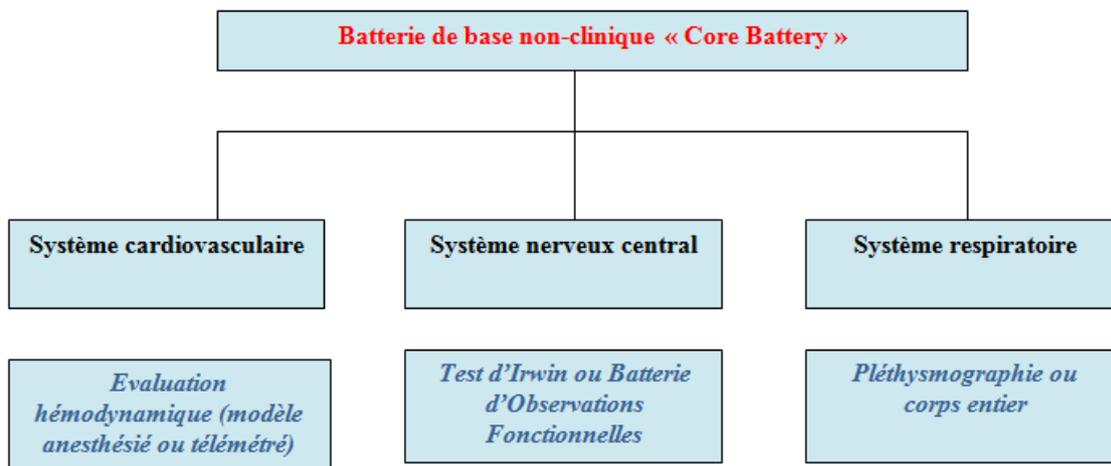


Figure 10 : Batterie de base pour l'étude de la pharmacologie de sécurité décrite dans ICH S7A
Etude des trois fonctions vitales majeures : le système cardiovasculaire, le système nerveux central et le système respiratoire

En fonction de la structure chimique de la molécule et/ou des données déjà existantes (organe(s) cible(s) identifié(s) lors des études de toxicologie générale, site d'action de la molécule, etc.), d'autres fonctions telles que la fonction rénale ou gastro-intestinale peuvent être également explorées.

Les effets du candidat médicament sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque, et l'ECG doivent être évalués au moyen de méthodes *in vitro* et *in vivo*. Des investigations supplémentaires sont également suggérées afin d'évaluer les effets du produit sur la repolarisation et la conductance cardiaque.

Les études de la batterie de base peuvent être complétées par des études supplémentaires *in vitro* ou *in vivo*, dites études de « suivi », mises en place afin d'explorer le mécanisme d'action à l'origine de l'effet observé et permettant ainsi de mieux caractériser le risque. Ainsi, pour le système cardiovasculaire, une mesure du débit cardiaque, de la contractilité ventriculaire et des résistances vasculaires peut être envisagée.

Dans le but de garantir des résultats fiables et de qualité, les études de pharmacologie de sécurité doivent être réalisées conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Néanmoins, les laboratoires ont la possibilité de mettre en place des études précoces non conformes aux BPL mais, dans ce cas, les résultats obtenus n'auront pas de poids d'un point de vue réglementaire.

2) Evolution réglementaire de la pharmacologie de sécurité

a) La ligne directrice ICH S7B et évaluation préclinique du risque pro-arythmique

La recommandation ICH S7A s'est rapidement révélée insuffisante, notamment en matière d'évaluation du risque pro-arythmique concernant, en particulier, le retard à la repolarisation ventriculaire. En effet, plusieurs médicaments ont perdu leur AMM ou ont subi des restrictions d'utilisation liées à leur potentiel pro-arythmique (Guillon, 2010 ; Redfern *et al.*, 2003). C'est pourquoi les autorités et les industriels ont élaboré en 2005 la ligne directrice ICH S7B : « The non-clinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization by Human Pharmaceuticals » qui a pour but d'identifier le potentiel d'une molécule et/ou de ses métabolites à retarder la phase de repolarisation ventriculaire et d'établir la relation dose-effet ou concentration-effet. Pour cela, la recommandation ICH S7B repose sur deux essais complémentaires que sont la réalisation d'un test *in vitro* de mesure du courant I_{Kr} sur cellules transfectées avec le canal potassique hERG humain et d'une étude *in vivo* de mesure de l'intervalle QT de l'ECG sur animaux télémétrés ou anesthésiés (Figure 11).

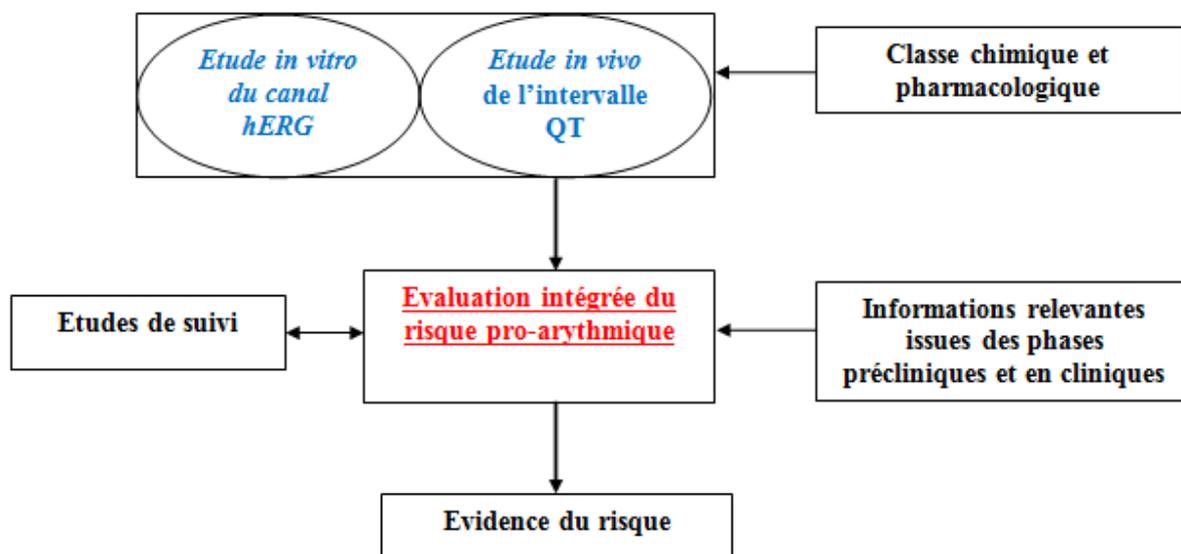


Figure 11 : Stratégie d'évaluation préclinique du risque pro-arythmique décrite dans ICH S7B

Des études de « suivi » peuvent être réalisées, basées sur la mesure de paramètres électrophysiologiques utilisant des modèles *in vitro* sur cellules (« binding », patch clamp), des modèles *ex-vivo* sur tissus ou organes (fibre de Purkinje, cœur isolé de Langendorff) ou des modèles *in vivo* (animaux télémétrés ou anesthésiés). Les résultats issus de ces études font ensuite l'objet d'une évaluation intégrée du risque qui considère l'ensemble des données des études précliniques afin de pouvoir prédire l'existence d'un risque d'allongement de l'intervalle QT chez l'homme.

b) *La ligne directrice ICH E14 et évaluation clinique du risque pro-arythmique*

La recommandation ICH E14 « Clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs » a été élaborée afin de compléter la guideline ICH S7B. En effet, pour certaines molécules, les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* de la ligne directrice ICH S7B ne sont parfois pas corrélés avec les données observées en clinique (Strnadova, 2005) et des molécules sans effet sur la durée de l'intervalle QT dans les études précliniques se révèlent toxiques en phase clinique.

L'étude clinique standardisée, décrite dans la recommandation ICH E14, consiste à analyser l'ECG de volontaires sains traités par le produit à tester. La sensibilité de l'étude est généralement démontrée avec un groupe contrôle positif traité par la moxifloxacine à forte dose devant induire un allongement de l'intervalle QT proche de 5 ms (seuil de préoccupation réglementaire). *In fine*, les résultats de cette étude permettent de déterminer la conduite à tenir lors des essais cliniques, notamment avec un suivi des patients jusqu'en phase 4 qui sera plus important si une alerte est détectée, voire un arrêt du développement du produit si besoin.

c) *Perspectives : la réglementation CiPA*

Aujourd'hui, l'évaluation du risque pro-arythmique, régi par la ligne directrice ICH S7B, est essentiellement focalisée sur l'inhibition du canal hERG associée à un retard à la repolarisation, un allongement de l'intervalle QT et l'apparition de torsades de pointe en phase clinique. Néanmoins, une molécule qui bloque le canal hERG n'entraîne pas systématiquement un allongement de la durée de repolarisation et n'engendre pas systématiquement des torsades de pointe (ex : amiodarone) (Dumotier *et al.*, 2008).

De plus, une molécule sans effet sur le canal hERG ne sera pas pour autant dénuée de risque dans la survenue d'arythmies puisque celles-ci peuvent impliquer d'autres canaux cardiaques voltage dépendant, notamment les canaux calciques CaV1.2 et les canaux sodiques NaV1.5 (ex : flécainide).

C'est dans ce contexte qu'en juillet 2013 un consortium regroupant la Food and Drug Administration (FDA), le Cardiac Safety Research Consortium (CSRC) et le Health and Environmental Sciences Institute (HESI) a suggéré la mise en place d'une nouvelle stratégie d'évaluation du risque pro-arythmique. Il s'agit du projet CiPA (Comprehensive *In Vitro* ProArrhythmia Assay) qui est basé sur de nouveaux modèles permettant d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité fonctionnelle des molécules (Figure 12).

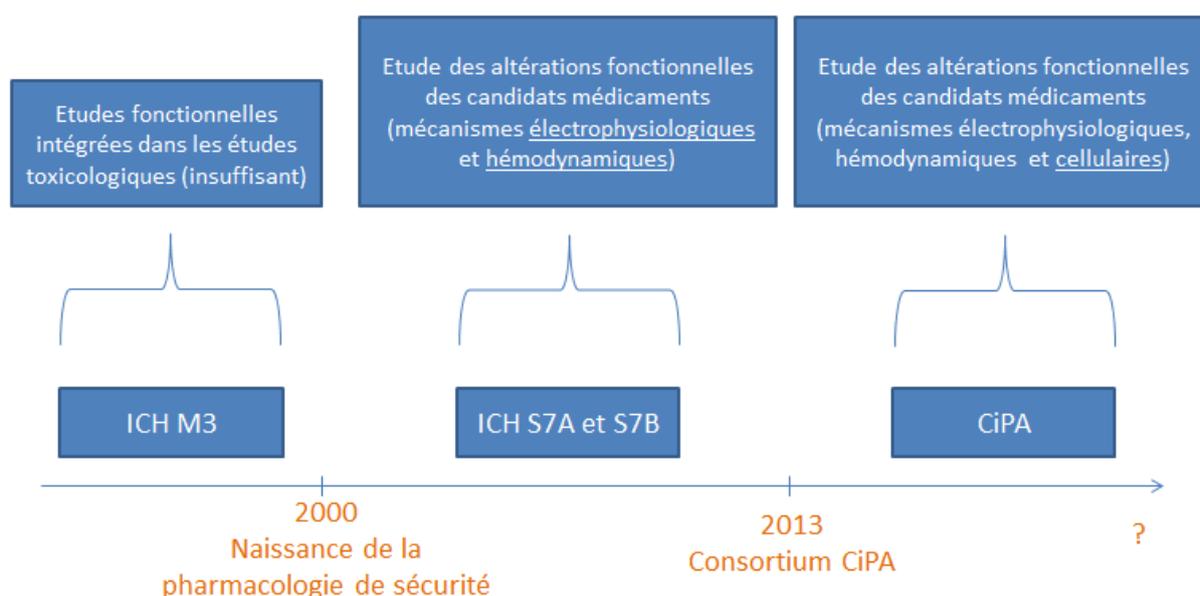


Figure 12 : Naissance et évolution de la pharmacologie de sécurité

A terme, la mise en place de ces outils devrait permettre une détection plus précoce des arythmies et une meilleure compréhension de leur genèse. Il sera alors possible d'établir une classification des substances en fonction de leur risque pro-arythmique (Kramer *et al.*, 2013). De plus, dans le respect de la règle des 3Rs (Réduire, Raffiner, Remplacer) concernant l'éthique appliquée à l'expérimentation animale, la validation de ces modèles permettrait une réduction importante de l'utilisation des modèles *in vivo*.

IV) Modèles précliniques d'évaluation de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments

Les modèles précliniques d'évaluation de la toxicité cardiovasculaire qui vont être détaillés dans ce chapitre rassemblent des modèles standards utilisés en routine par les laboratoires ainsi que des modèles émergents actuellement en cours de validation (Tableau 7).

Tableau 7 : Méthodes d'évaluation préclinique de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments et paramètres mesurés

Méthodes	Paramètre(s) évalué(s)
<i>In vitro</i>	
« Binding » (canaux, récepteurs, enzymes, transporteurs)	IC ₅₀ , Ki
Patch clamp	IC ₅₀
Modèle de cœur isolé de Langendorff (lapin ou cobaye)	Pression ventriculaire gauche, fréquence cardiaque, dP/dt _{max} (contractilité), ECG
Fibre de Purkinje	dV/dt (courant sodique), APD ₉₀ (courant potassique), APD ₄₀ (courant calcique)
hiPSC-CMs	Viabilité cellulaire, Impédance, Mesure des courants ioniques, Contractilité, Activité des enzymes mitochondriales, Stress oxydatif, Apoptose, Morphologie des cellules, Etude du métabolisme lipidique, Etudes des voies de signalisation
<i>In vivo</i>	
Animaux anesthésiés	Pression artérielle, ECG, dP/dt _{max} , fréquence cardiaque, pression ventriculaire gauche, débit cardiaque, résistances vasculaires
Animaux télémetrés	Télémetrie externe (gilet) : ECG et fréquence cardiaque
	Télémetrie interne (implants) : ECG, température corporelle, pressions artérielles, fréquence cardiaque, dP/dt _{max}
Biomarqueurs (troponine)	Taux plasmatiques indicateurs de lésion cardiaque
Echocardiographie	Fraction d'éjection

1) **Modèles standards**

Les fonctions physiologiques cardiovasculaires sont médiées par des interactions entre des ligands et des récepteurs ou des canaux situés sur les organes. Ces modèles étudient donc ces interactions et leur(s) conséquence(s) après avoir été exposés aux molécules en développement, et ce à différentes échelles (cellulaire/membranaire, tissulaire, organe entier).

a) « Binding »

L'étude de « binding », encore appelée étude de liaison, permet d'étudier l'interaction entre une molécule et un récepteur et d'en déduire une affinité par une constante d'inhibition K_i . Ainsi, le « binding » est un outil de screening qui permet d'effectuer une première sélection des molécules et de détecter d'éventuelles alertes qui devront faire l'objet d'une attention particulière lors des études ultérieures.

Il existe deux types de tests de « binding » permettant d'obtenir le profil d'interactions réceptorielles d'une molécule. Le « binding » compétitif (par méthode de déplacement) est réalisé sur des préparations de membrane purifiée et permet d'étudier l'affinité entre un ligand et sa cible au travers du déplacement d'un radioligand fixé à une cible (récepteur, canal, enzyme ou transporteur) par un ligand non radiomarqué (molécule à tester) (Bowes *et al.*, 2012). Ainsi, au fur et à mesure de la fixation de la molécule sur le récepteur, la radioactivité émise par le complexe ligand radioactif-cible va décroître. La concentration de produit capable de déplacer 50 % de la totalité du ligand radioactif (IC_{50}) peut ainsi être mesurée.

Le « binding » fonctionnel est, quant à lui, réalisé sur des cellules de mammifères transfectées avec la cible d'intérêt d'origine humaine. Cette technique permet d'étudier le caractère agoniste ou antagoniste d'un ligand par différentes méthodes telles que la mesure de seconds messagers intracellulaires libérés (calcium, AMP cyclique) (Bowes *et al.*, 2012).

La réglementation ICH S7A ne détaille pas les cibles à tester dans ces études de « binding », c'est pourquoi les laboratoires ont décrit un panel minimum de cibles à étudier en priorité du fait de leur importance dans la sécurité cardiovasculaire (Bowes *et al.*, 2012) (Tableau 8).

Tableau 8 : Exemples de cibles étudiées dans les études de « binding » et leur(s) impact(s) physiologique(s) cardiovasculaire(s)

Cible	Effets agonistes ou d'activation	Effets antagonistes ou d'inhibition
GPCR		
Récepteur adénosine A2a	↑ FC, ↓ PA, ↓ agrégation plaquettaire	↑ PA, ↑ agrégation plaquettaire
Récepteur adrénergique α1a	↑ PA, inotrope +, potentiel arythmique	Hypotension orthostatique et ↑ FC
Récepteur adrénergique α2a	↓ PA et ↓ FC	
Récepteur adrénergique β1	↑ FC, ↑ contractilité	↓ FC et ↓ PA
Récepteur adrénergique β2	↑ FC	↓ PA
Récepteur dopaminergique D2	↓ FC	Hypotension orthostatique
Récepteur muscarinique M1	Hypertensions, tachycardies	
Récepteur muscarinique M2	↓ FC, ↑ PA, inotrope -, ↓ conduction cardiaque	Tachycardies
Récepteur sérotoninergique 5-HT1b	Vasoconstriction des artères coronaires, ↑ PA	
Récepteur sérotoninergique 5-HT2a	Syndrome sérotoninergique, agrégation plaquettaire	
Récepteur sérotoninergique 5-HT2b	Valvulopathies cardiaques, hypertension pulmonaire	
Récepteur de la vasopressine V1a	↑ PA, ↓ FC, fibrose myocardique, hypertrophie cardiaque	
Canaux ioniques		
Canal sodique voltage dépendant NaV1.5		↓ conduction cardiaque, ↑ intervalle QRS, arythmies
Canal potassique hERG		↑ intervalle QT, torsades de pointe, ↓ FC
Canal calcique voltage dépendant CaV1.2		↓ conduction, ↓ FC, ↓ PA
Enzymes		
Acétylcholinestérase		↓ FC, ↓ PA
COX2		Infarctus du myocarde, athérombose, AVC, ↑ PA
Phosphodiéstérase 3A		Arythmies ventriculaires, ↑ FC, ↑ contractilité cardiaque, ↓ PA

FC = fréquence cardiaque, PA = pression artérielle, AVC = accidents vasculaires cérébraux

On distingue ainsi plusieurs grandes familles de cibles, notamment les récepteurs adrénergiques et muscariniques du système nerveux autonome, les récepteurs sérotoninergiques, les récepteurs dopaminergiques, les canaux ioniques cardiaques ainsi que certaines enzymes (COX-2, acétylcholinestérase, etc.). De part leur rôle physiologique dans l'excitation cellulaire, les interactions entre une molécule et les canaux ioniques sont depuis longtemps associées à l'apparition d'effets indésirables. Par ailleurs, une attention particulière est accordée aux enzymes telles que la COX-2 du fait de son implication dans l'apparition d'effets cardiovasculaires suite à l'administration prolongée d'Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS) spécifiques de COX-2 (ex : Rofécoxib). Les différents récepteurs étudiés appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (G Protein-Coupled Receptor) qui ont un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire.

L'interaction d'un ligand sur ces récepteurs peut avoir un effet positif agoniste (activateur) ou un effet négatif antagoniste (inhibiteur). La fixation d'un agoniste sur le récepteur induit un changement de conformation de ce dernier permettant à la forme active du récepteur de s'associer à la protéine G et induisant, au niveau de la sous-unité $G\alpha$, l'échange du guanosine diphosphate (GDP) contre le guanosine triphosphate (GTP) (Figure 13). Cet événement entraîne alors la dissociation du trimère, la forme active α -GTP se séparant du complexe $\beta\gamma$. Les sous-unités α -GTP, d'une part, et $\beta\gamma$, d'autre part, sont alors susceptibles d'activer divers effecteurs (adénylate cyclase, phospholipases, protéines kinases, canaux ioniques ...) à l'origine de l'effet physiologique.

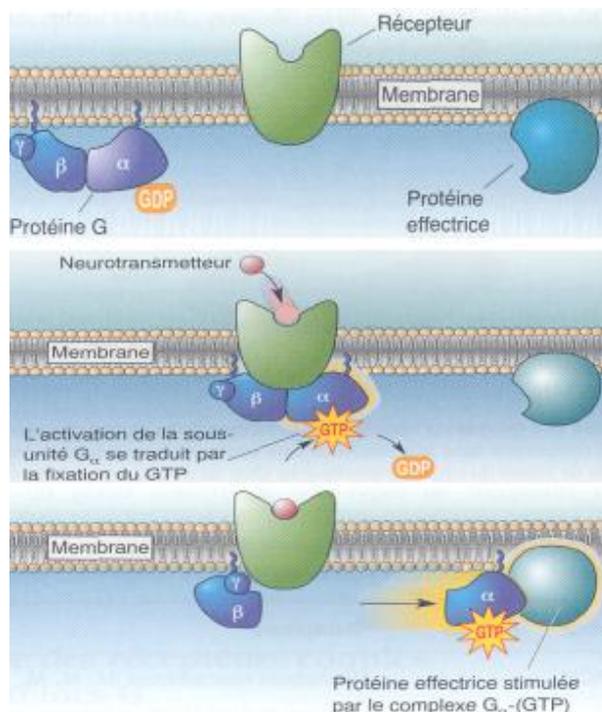


Figure 13 : Mécanisme de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Lors de la fixation du ligand au récepteur, la sous-unité G_{α} va échanger du GDP contre du GTP entraînant la dissociation du récepteur trimère avec la sous-unité G_{α} et la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ qui vont pouvoir activer divers effecteurs cellulaires

Ainsi par exemple, une activation du récepteur 5-hydroxytryptamine de type 2B et du récepteur muscarinique M2 est associée à l'apparition de valvulopathies cardiaques ainsi qu'à une diminution de la contractilité, de la conduction et de la fréquence cardiaque, respectivement (Rothman *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2009).

Outre les récepteurs couplés à la protéine G, d'autres cibles sont étudiées en « binding », notamment les canaux cardiaques potassique (hERG), sodique (Nav1.5) et calcique (CaV1.2) dont l'inhibition par un ligand peut être associée à l'apparition d'arythmies cardiaques (Sanguinetti *et al.*, 1995 ; Redfern *et al.*, 2003).

Le « binding » permet ainsi d'anticiper les effets « on-target » (affinité du composé pour le(s) site(s) d'action désiré(s) à l'origine de l'effet thérapeutique) et les effets « off-target » (interaction de la molécule avec des sites d'action qui nécessitent des investigations approfondies en termes de sécurité). Ces interactions « off-target » peuvent être à l'origine d'effets indésirables en phases préclinique et clinique, c'est pourquoi il est important d'établir un profil d'interactions réceptorielles le plus tôt possible dans le développement d'un produit (Bowes *et al.*, 2012).

b) Patch clamp manuel et automatique

Le patch clamp est un système unicellulaire permettant de mesurer les courants ioniques à travers des cellules d'expression hétérologue (cellules embryonnaires de rein humain HEK293, cellules d'ovaire de hamster chinois CHO), c'est-à-dire n'exprimant pas naturellement la protéine d'intérêt, et donc dans lesquelles un type de canal humain a été transfecté (Dumoulin *et al.*, 2006). Deux électrodes sont utilisées, l'une pour stimuler électriquement la cellule et l'autre, reliée à un amplificateur, pour mesurer son activité électrique (Figure 14). Ainsi, si la molécule à tester bloque le canal d'intérêt, les ions ne pourront plus traverser la membrane cellulaire et le courant électrique sera modifié.

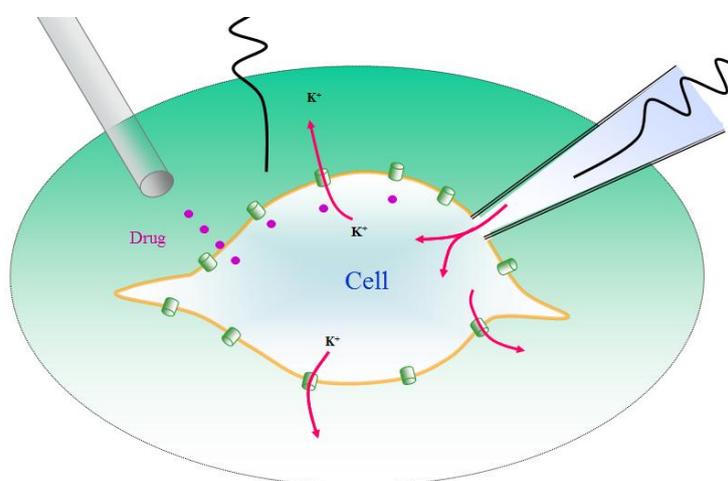


Figure 14 : Système de patch clamp manuel sur cellule HEK293 exprimant le canal hERG

Une électrode stimule électriquement la cellule et l'autre électrode mesure son activité électrique durant l'administration d'une molécule

Toutefois, ces études ne permettent d'étudier qu'un seul type de canal exprimé en nombre limité sur une cellule (Guillon, 2010). Il est donc nécessaire d'associer le test de patch clamp à d'autres modèles afin d'avoir une vision globale des différents courants impliqués.

Le patch clamp manuel est la méthode *in vitro* de référence permettant d'étudier les interactions fonctionnelles entre la molécule et les canaux ioniques cardiaques (Steidl-Nichols, 2014). L'application du produit se fait cellule par cellule par un opérateur qui doit également contrôler le courant électrique afin d'assurer la formation du « cil » entre la cellule et l'électrode. Cette méthode permet d'obtenir des résultats robustes et pertinents et permet de mesurer la concentration intracellulaire du produit afin de s'assurer que les cellules ont bien été exposées.

Cependant, cette technique requiert du temps ainsi qu'une main d'œuvre formée et qualifiée qui ne permet pas de tester un grand nombre de molécules.

Pour pallier ces inconvénients, des méthodes de patch clamp automatisé ont été développées dans lesquelles l'application du produit se fait via l'utilisation de plaques multipuits contenant les cellules et dans lesquelles la substance est administrée automatiquement. Des appareils tels que le QPatch® (Sophion) et le CytoPatch® (Cytocentrics) (Figure 15) sont utilisés et permettent de tester un grand nombre de molécules dans un délai plus court. Par comparaison avec la technique manuelle, le patch clamp automatisé ne permet pas, à ce jour, de doser la concentration de produit en contact avec la cellule afin de s'assurer que cette dernière a bien été exposée.

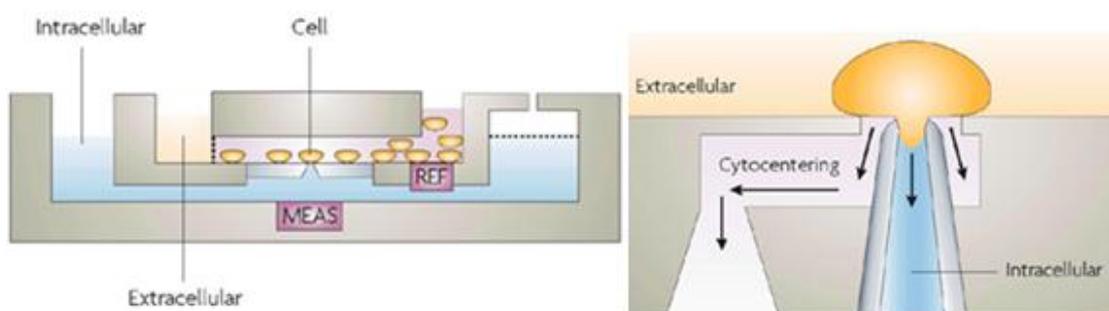


Figure 15 : Systèmes de patch clamp automatisés.

QPatch® (gauche) et CytoPatch® (droite)

c) Fibre de Purkinje

Le modèle de fibre de Purkinje permet d'évaluer, à l'échelle d'un tissu ventriculaire, les interactions entre une molécule et les canaux cardiaques. En effet, la fibre de Purkinje est une fibre musculaire présente dans la paroi interne des ventricules qui assure la conduction intraventriculaire. Dans le cadre de la réalisation des essais de cardiotoxicité en phase préclinique, la fibre de Purkinje est généralement prélevée sur des lapins femelles dont la sensibilité cardiaque est supérieure aux autres espèces (Amuzescu *et al.*, 2014). La fibre est stimulée électriquement et une microélectrode permet d'enregistrer et de visualiser le potentiel d'action ventriculaire (Guillon, 2010). Selon la fréquence de stimulation, des conditions de bradycardie (pro-arythmiques) ou de tachycardie peuvent être mimées.

A partir du potentiel d'action, plusieurs paramètres peuvent être mesurés tels que la dérivée de la vitesse de conduction en fonction du temps (dV/dt) reflétant le courant sodique I_{Na} , la durée du potentiel d'action à 90 % (APD_{90}) reflétant le courant I_{Kr} et la durée du potentiel d'action à 40 % (APD_{40}) reflétant le courant calcique I_{Ca} (Figure 16).

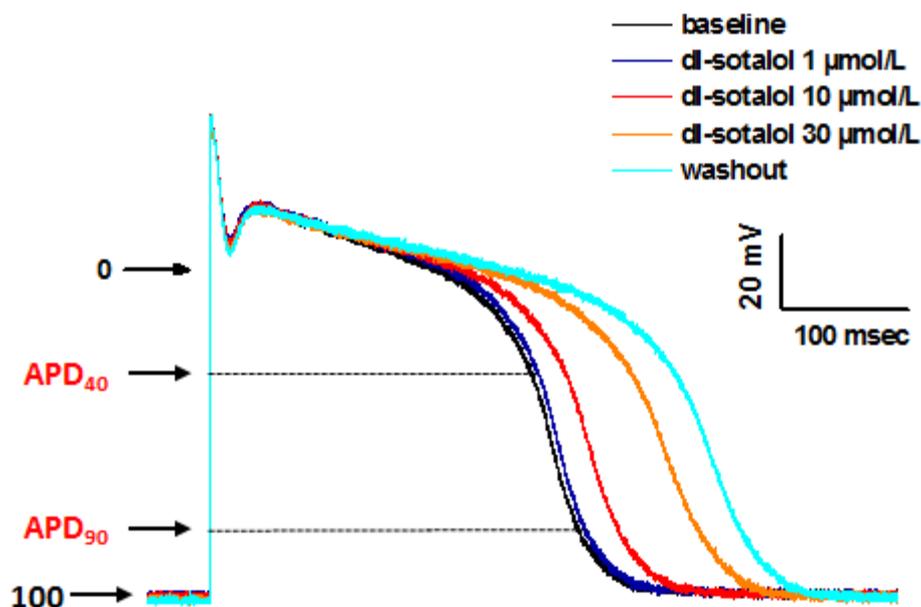


Figure 16 : Exemple de potentiel d'action du Sotalol aux concentrations de 1, 10 et 30 $\mu\text{mol/L}$
Les durées de potentiel d'action à 40% et à 90% augmentent de manière concentration-dépendante

Ce modèle permet d'avoir une vision intégrée de l'ensemble des courants impliqués dans la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire. Il requiert toutefois une certaine maîtrise de l'opérateur et se révèle chronophage.

d) Cœur isolé de Langendorff

Le cœur isolé de Langendorff permet d'étudier, de manière plus intégrée que la fibre de Purkinje, les interactions entre une molécule et les canaux cardiaques avec notamment l'obtention d'un ECG similaire à celui observé en phase clinique. Le cœur d'un cobaye ou d'un lapin est prélevé lors d'une anesthésie puis perfusé via l'aorte avec de la solution physiologique de Krebs' (constituée principalement de chlorure de sodium et de potassium, de tampons phosphates et de glucose) à pression constante et de manière rétrograde (Figure 17).

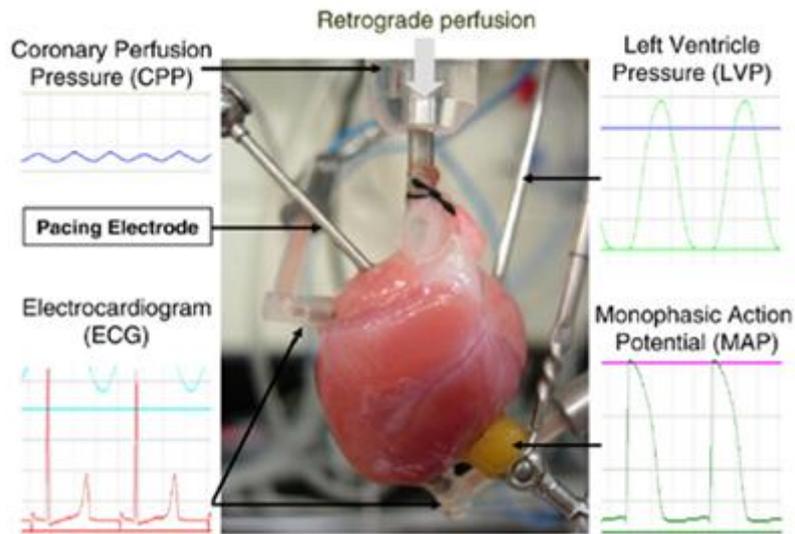


Figure 17 : Modèle Langendorff sur cœur isolé de cobaye
(Guo *et al.*, 2009)

Un ballon intégrant un capteur de pression est placé dans le ventricule gauche afin d'y mesurer la pression ventriculaire et la fréquence cardiaque puis d'en dériver la dP/dt , indice indirect de la contractilité du myocarde. Deux électrodes sont placées sur l'oreillette droite et sur le ventricule gauche afin de mesurer les paramètres ECG (intervalles RR, PR, PQ, QT, QTcB et QTcF, ainsi que la durée du complexe QRS).

Ce modèle possède l'ensemble des éléments présents à la surface du cœur (enzymes, transporteurs, canaux, récepteurs) et permet d'avoir une vision intégrée des différents paramètres électrophysiologiques cardiaques. Les canaux ioniques cardiaques de l'homme et du cobaye étant similaires, l'utilisation de cette espèce est privilégiée dans ce modèle (Marks *et al.*, 2012). Néanmoins, comme pour l'ensemble des modèles décrits précédemment, le cœur isolé de Langendorff permet d'étudier uniquement les effets d'une molécule mère sans prendre en compte ses éventuels métabolites et les phénomènes d'Absorption, de Distribution, de Métabolisation et d'Excrétion (ADME).

e) Animaux télémetrés

Les études de télémétrie consistent à mesurer, à distance et en temps réel, des paramètres biologiques cardiovasculaires sur des animaux vigiles. Les effets cardiovasculaires sont évalués en intégrant les boucles de régulation physiologiques et les différentes voies métaboliques, plaçant ainsi le modèle de télémétrie comme une méthode de référence.

Le laboratoire se doit d'utiliser l'espèce ayant le profil métabolique le plus proche de celui de l'homme pour le principe actif considéré. Ainsi le cobaye, le chien ou le primate non-humain sont généralement utilisés.

Il existe deux types de télémétries. La première, non-invasive, est pratiquée essentiellement en toxicologie et utilise des gilets placés sur l'animal qui permettent, via des électrodes de surface, l'acquisition du signal de la fréquence cardiaque, mais pas de la pression artérielle. La seconde, réalisée en pharmacologie de sécurité, nécessite une chirurgie préalable avec la mise en place de cathéters de pression et d'électrodes ECG reliés à des implants positionnés sous la peau. Ces derniers émettent des ondes captées par une antenne réceptrice qui envoie les signaux à un système de traitement de données (Hamdam *et al.*, 2013) (Figure 18). Ces méthodes permettent ainsi l'étude de paramètres hémodynamiques et ECG sur 24 heures et en temps réel.

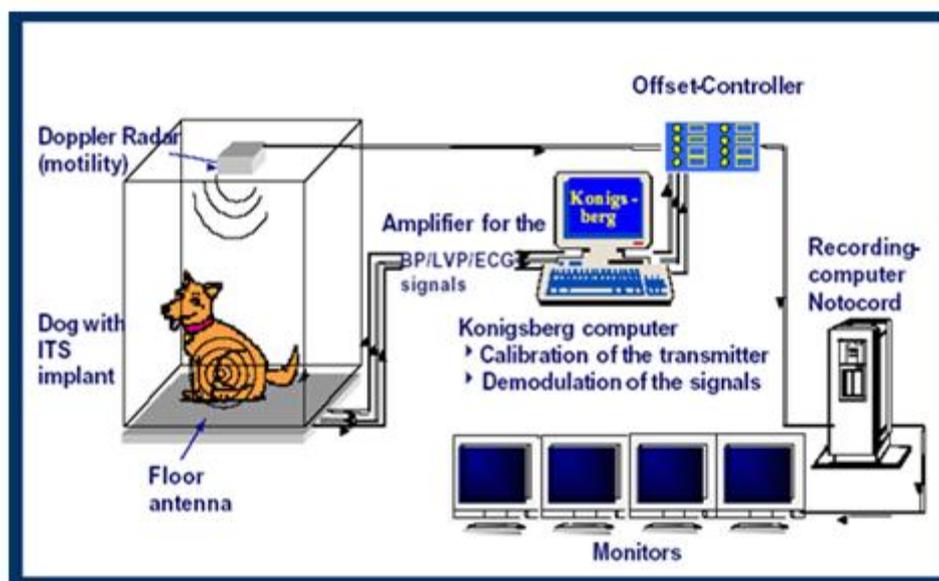


Figure 18 : Principe de la télémétrie chez le chien

L'animal est équipé de cathéters de pression et d'électrodes ECG reliés à des implants sous la peau. Ces implants émettent des ondes captées par une antenne réceptrice qui envoie les signaux à un système de traitement de données

Bien que la réglementation recommande la réalisation d'études BPL sur animaux naïfs (c'est-à-dire n'ayant jamais été traités), des tests précoces non BPL peuvent être mis en place avec l'utilisation d'animaux non-naïfs (c'est-à-dire ayant été préalablement utilisés pour une autre étude et soumis à une période de « wash-out » suffisante pour permettre l'élimination totale du produit administré précédemment).

L'utilisation d'animaux non-naïfs permet de ne pas sacrifier systématiquement les animaux à la fin des études, respectant ainsi la règle des 3Rs. Les effets associés au(x) traitement(s) antérieur(s) doivent être néanmoins bien documentés.

f) Animaux anesthésiés

Ce second modèle *in vivo* permet d'étudier les effets cardiovasculaires d'une molécule sur des animaux anesthésiés. Des animaux (le plus souvent des chiens ou des cobayes) sont anesthésiés au pentobarbital puis subissent une intubation endotrachéale afin de les ventiler artificiellement avec de l'air ambiant enrichi en oxygène pour maintenir les paramètres sanguins dans les valeurs physiologiques (pO₂, pCO₂, pH). Un cathéter est introduit dans l'aorte thoracique afin de mesurer la pression artérielle. L'administration du produit s'effectue via des cathéters placés dans la veine céphalique. Des sondes reliées à des capteurs sont introduites dans les artères carotide et fémorale afin de mesurer les débits sanguins et les résistances vasculaires. Un autre cathéter muni d'un capteur de pression est également placé dans le ventricule gauche afin d'évaluer la pression ventriculaire gauche, permettant une estimation indirecte de la contractilité cardiaque. En parallèle, les paramètres ECG sont mesurés à l'aide d'électrodes placées au niveau de l'épicarde. Ainsi, du fait de son caractère invasif, ce modèle permet l'étude de davantage de paramètres par rapport à la télémétrie. A la fin de l'étude, les animaux sont sacrifiés par une overdose de pentobarbital.

Ce modèle présente l'avantage de s'affranchir de certains effets induits par la molécule tels que des effets neurovégétatifs comme les vomissements, les convulsions ou les effets excitants et tachycardisants non spécifiques du produit pouvant perturber les paramètres hémodynamiques et l'ECG (Marks *et al.*, 2012). En outre, ce modèle offre la possibilité de tester des doses supérieures à celles utilisées chez l'animal vigile et de réaliser des analyses pharmacocinétiques simultanément (Marks *et al.*, 2012). Néanmoins, l'administration par voie orale ne peut pas être réalisée avec ce modèle. Seule la voie intraveineuse (perfusion ou bolus) peut être utilisée, ce qui limite son utilisation aux préparations liquides et donc aux molécules solubles. De plus, l'usage du pentobarbital restreint la durée de ces études à 4 heures. Enfin, les agents anesthésiants sont à l'origine d'une augmentation du rythme cardiaque qui peut potentiellement masquer des allongements de l'intervalle QT ne survenant qu'à de faibles fréquences cardiaques.

g) Marqueurs de toxicité cardiovasculaire

1. Troponine sanguine

La troponine est un complexe protéique présent essentiellement dans les muscles cardiaques et squelettiques. De par son implication dans la régulation du flux calcique cellulaire, la troponine est impliquée dans la contraction du muscle cardiaque. Il existe différents sous-types de troponine qui sont des marqueurs sensibles et spécifiques, chez l'homme et chez l'animal, de dommages musculaires cardiaques causés par diverses pathologies induisant une souffrance cardiaque (infarctus du myocarde, hypertrophie ventriculaire gauche, insuffisance cardiaque, embolisme pulmonaire, etc.) (Babuïn & Jaffe, 2005 ; Korff *et al.*, 2006, Brian *et al.*, 2009). A ce titre, la troponine est reconnue en tant que marqueur biochimique de souffrances myocardiques en phase clinique, mais également en phase préclinique chez les animaux (O'Brien, 2008). Les études *in vivo* ont permis de montrer que la troponine est un marqueur des mêmes pathologies cardiaques retrouvées chez l'homme et chez l'animal, ce qui en fait un marqueur translationnel (défini comme étant un marqueur présent chez l'animal et ayant une valeur prédictive de toxicité chez l'homme) pouvant être employé chez de nombreuses espèces telles que le chien, le rat, le lapin, le cheval et la souris. Des modèles ischémiques de chien, rat et souris ont ainsi été utilisés pour montrer la corrélation entre la libération de troponine dans la circulation sanguine et l'histopathologie des lésions cardiaques (O'Brien, 2006).

L'utilisation de ce biomarqueur dans l'identification d'une cardiotoxicité induite par les médicaments est de plus en plus sollicitée. C'est le cas par exemple avec l'étude du taux plasmatique de troponine lors d'une administration en clinique par la doxorubicine, une molécule notoirement cardiotoxique. L'usage de la troponine a ainsi permis une bonne gestion du traitement en clinique avec une dose maximum d'anthracycline qui a pu être établie au préalable sans que cela n'entraîne des dommages cardiaques (Institute of Medicine, 2009). Dans un objectif similaire, la troponine peut également être employée afin de démontrer l'efficacité de molécules cardio-protectives visant à contrer les effets cardiotoxiques de certaines thérapies, notamment ceux des anticancéreux. Ainsi, des modèles de lapin employant la troponine sanguine en tant que biomarqueur de la cardiotoxicité induite par les produits oncologiques chez l'homme ont permis d'évaluer des thérapies cardio-protectives (Potacova *et al.*, 2007 ; Simunek *et al.*, 2004 ; 2005).

Plus récemment, l'usage de la troponine s'est étendue au domaine préclinique et plus précisément pour l'évaluation de la sécurité (Wallace *et al.*, 2004 ; O'Brien, 2006 ; Pugsley *et al.*, 2011). 68 études toxicologiques précliniques ont démontré l'efficacité de ce marqueur dans la détection de souffrances cardiaques induites par des médicaments. Des études précliniques de validation ont ainsi montré que l'augmentation du taux de troponine sanguin en réponse à une souffrance cardiaque est dose dépendante et associée à une diminution de la viabilité tissulaire et à une déplétion partielle du tissu en troponine (O'Brien, 2006).

Néanmoins, afin de devenir un biomarqueur relevant de la sécurité cardiaque, il est nécessaire de standardiser les méthodes de détection et de dosage de la troponine avec une attention particulière à porter à l'état cardiaque de base des animaux (un stress pouvant par exemple entraîner une nécrose cardiaque chez les rats), aux méthodes de prélèvements sanguins et de détection de la troponine (la technique méthode immuno-enzymatique « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) se révèle peu sensible dans la détection de dommages cardiaques légers).

Outre ces inconvénients, l'usage de la troponine en phase préclinique présente des avantages majeurs, avec une sensibilité plus importante qu'en phase clinique du fait de la présence, en simultanée, de groupes d'animaux contrôles et de méthodes d'analyse permettant d'éviter toute variabilité inter-essais. De plus, par comparaison avec d'autres biomarqueurs cardiaques tels que le Fatty Acid Binding Protein 3 (FABP-3), la myoglobine (Mb) ou encore la créatine kinase MB (CK-MB), la troponine apparaît comme le marqueur « gold standard » en matière de souffrance cardiaque induite par les médicaments en phase clinique (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison d'efficacité entre la troponine et d'autres biomarqueurs de souffrance cardiaque

(O'Brien, 2008)

Caractéristique	Troponine	CK-MB	FABP3	Mb
Spécificité tissulaire	Elevée	Modérée	Faible	Faible
Absence dans le sang en condition normale	Complète	Partielle	Partielle	Partielle
Sensibilité	Elevée	Faible	Elevée	Elevée
Facilité du test	Elevée	Faible	Modérée	Faible
Libération précoce dans le sang	Elevée	Modérée	Elevée	Elevée
Persistance dans le sang	Elevée	Modérée	Faible	Faible
Absence d'interférences	Elevée	Faible	Faible	Faible
Publication dans des articles précliniques	Elevée	Faible	Faible	Faible

Cependant, avant l'usage en routine de la troponine en tant que marqueur préclinique de souffrance cardiaque, des interrogations subsistent concernant les méthodes de quantification employées, la (les) sous-type(s) de troponine à quantifier, ou encore le seuil de significativité (Institute of Medicine, 2009).

2. Contractilité cardiaque

Des études ont montré que de nombreuses molécules possèdent des effets cardiotoxiques médiés par une altération de la contractilité cardiaque, comme cela est souvent rencontré lors de thérapies anticancéreuses qui entraînent une diminution de la fraction d'éjection (Marker *et al*, 2007 ; Sarazan *et al*, 2011 ; Wittelas & Telli, 2012 ; Yeh & Bickford, 2009). Les molécules à effet inotrope positif ou négatif résultent respectivement en une augmentation ou une diminution de la performance cardiaque pouvant engendrer une souffrance cardiaque plus ou moins importante en fonction de l'âge et de pathologies préexistantes. La ligne directrice ICH S7A ne préconise pas la mesure, en première intention, de la contractilité cardiaque.

Seuls quelques laboratoires évaluent ce paramètre de façon standard dans leurs études *in vivo* en mesurant un indice de contractilité indirect, le dP/dt_{max} (en mmHg/s). L'interprétation de ce dernier doit se faire prudemment du fait qu'il est influencé par les composantes de précharge et de postcharge (Markert *et al*, 2012 ; Sarazan *et al*, 2012). De nouvelles méthodes de mesure préclinique de la contractilité cardiaque émergent, notamment l'échocardiographie qui permet l'étude de la fraction d'éjection (Cools *et al*, 2014). Cette méthode était jusqu'à présent principalement réservée aux études cliniques.

L'échocardiographie et la mesure du dP/dt_{max} ont ainsi fait l'objet d'une comparaison lors d'une étude sur chiens télémétrés dont la contractilité cardiaque a été modifiée suite à l'administration de molécules inotropes positives ou négatives (clonidine, milrinone, minoxidil, atenolol, isoprenaline et vérapamil). Une corrélation linéaire importante entre ces deux méthodes a ainsi pu être mise en évidence (Figure 19), avec un changement de 1 000 mmHg/s du dP/dt_{max} correspondant à un changement de 7 % de la fraction d'éjection (Cools *et al*, 2014).

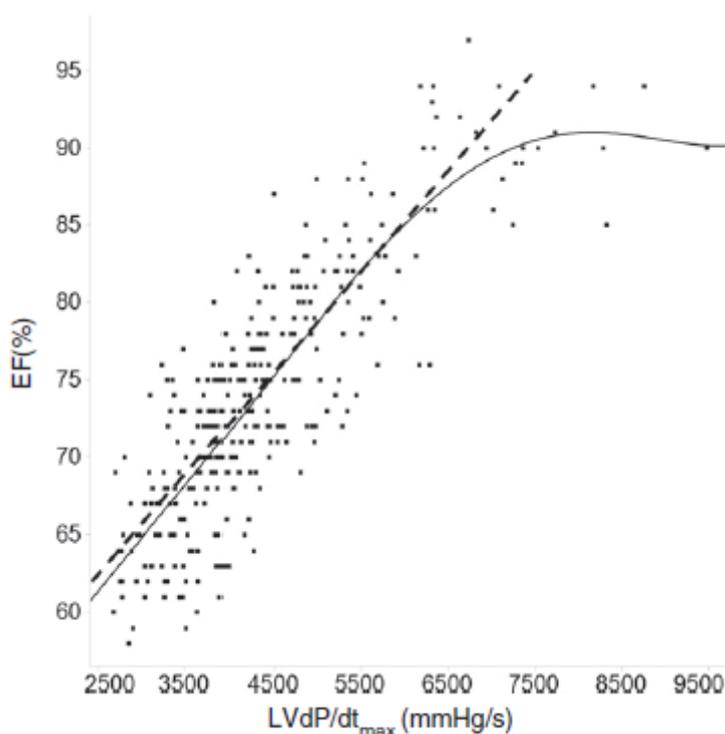


Figure 19 : Etude de la dP/dt_{max} en fonction de la fraction d'éjection

*Données individuelles de mesure de la dP/dt_{max} et de la fraction d'éjection (EF) chez des chiens traités par des molécules inotropes (n=312) avec une régression polynomiale linéaire (Cools *et al.*, 2014).*

Cette corrélation permet ainsi d'établir un lien direct entre les mesures de contractilité cardiaque en phase préclinique et les paramètres échocardiographiques étudiés en phase clinique. Ce lien translationnel permet ainsi d'obtenir davantage d'informations sur le profil de sécurité cardiaque du produit et sur son développement en phase clinique. Ainsi, l'effet des molécules sur la contractilité cardiaque peut être étudié via la méthode invasive du dP/dt_{max} , ce dernier étant considéré comme un paramètre translationnel à l'homme, bien qu'il soit difficilement étudié en routine en phase clinique.

2) Modèles émergents

Aujourd'hui, plusieurs modèles précliniques standards *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* permettent d'évaluer le profil de sécurité cardiovasculaire des molécules en développement, mais une attention particulière est accordée aux futurs modèles que sont les cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines (hiPSC-CMs) et les modélisations *in silico*.

a) Méthodes in silico

La technologie *in silico* appliquée au domaine pharmaceutique a vu le jour au début des années 1960 avec le développement des études de relations structure/activité (Cavero *et al.*, 2009). Depuis quelques années, le développement de ces modèles bio-informatiques ne cesse de croître, notamment dans le domaine cardiaque, plus particulièrement avec les dynamiques électriques et mécanistiques. En effet, cette technologie pourrait devenir un outil de screening dans l'évaluation de la sécurité cardiaque des candidats médicaments (Mirams *et al.*, 2012). Un modèle de « cœur virtuel » a ainsi été développé et fait aujourd'hui l'objet d'études pour le soumettre à diverses conditions physiologiques, pathologiques ou pharmaceutiques (Clayton *et al.*, 2011; Henriquez, 2014) (Figure 20). L'usage de ce cœur virtuel permet d'étudier l'activité électrique cardiaque au niveau cellulaire, tissulaire et au niveau de l'organe entier.

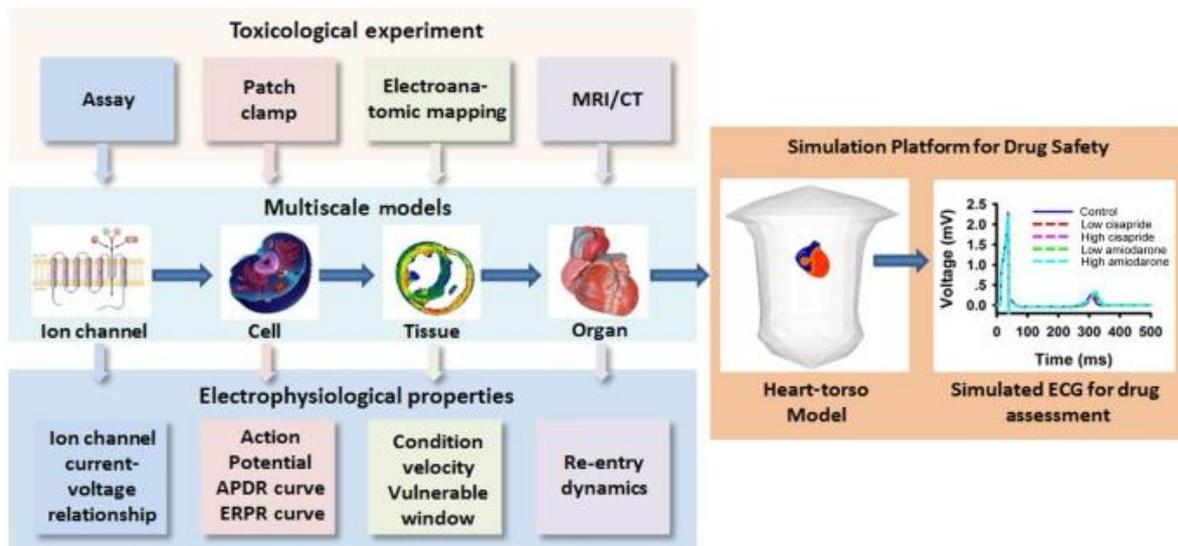


Figure 20 : Illustration schématique du cœur virtuel en tant que plateforme d'évaluation de la sécurité des médicaments

Plateforme d'étude à plusieurs échelles permettant d'étudier l'effet d'une molécule sur l'ECG humain (Yuan et al., 2015).

Dans cette optique, des progrès ont été réalisés dans la modélisation mathématique des interactions entre une molécule et les différents canaux ioniques cardiaques (Yuan et al, 2015). Les activités électriques cardiaques du cisapride et de l'amiodarone, deux molécules allongeant le QT de l'ECG mais présentant un profil pro-arythmique différent, ont par exemple été étudiées via ce modèle.

Les résultats obtenus ont ainsi permis de montrer que le profil inhibiteur multicanaux (hERG et calcique) de l'amiodarone est impliqué dans la sécurité cardiaque de ce produit, par rapport au cisapride qui lui est un inhibiteur pur du canal hERG et qui se révèle pro-arythmique. Malgré son caractère prometteur, des progrès restent à faire avant l'implémentation de ce cœur virtuel dans l'évaluation en routine du risque cardiaque des candidats médicaments. Davantage d'études doivent être réalisées afin d'intégrer un jeu complet de données expérimentales nécessaires à la validation de ce modèle d'interaction entre une molécule et les canaux ioniques cardiaques. Par ailleurs, les différents types cellulaires cardiaques doivent être incorporés dans ce modèle afin de simuler l'action d'une molécule sur l'intégralité du cœur, et pas seulement sur une seule région telle que le ventricule. Enfin, il est nécessaire d'intégrer les paramètres du système nerveux autonome dont des modifications peuvent jouer un rôle dans les arythmies (Yuan et al, 2015).

b) Cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines

Les récentes avancées dans le domaine des cellules souches pluripotentes ont conduit à la possibilité de produire des cardiomyocytes *in vitro* à partir de cellules souches humaines. L'usage de ces cardiomyocytes en tant que modèle de screening pour évaluer la sécurité cardiaque des médicaments constituerait une avancée significative du fait de leur relevance biologique et de leur importante capacité de production (Kraushaar *et al*, 2012). Il existe deux types de cellules pluripotentes qui peuvent se différencier en cardiomyocytes, les hiPSCs (human induced pluripotent stem cells) et les hESCs (human embryonic stem cells). Seules les hiPSCs seront développées dans ce mémoire car il s'agit de lignées déjà commercialisées qui ne font pas l'objet de restrictions éthiques.

De récentes études considèrent les hiPSC-CM comme un modèle fiable d'évaluation de la cardiotoxicité électrophysiologique et structurelle des médicaments (Abassi *et al*, 2012 ; Guo *et al*, 2011, 2013 ; Jonsson *et al*, 2011 ; Pointon *et al*, 2013 ; Cohen *et al*, 2011). Des cellules somatiques différenciées (fibroblastes) de patients sains ou atteints de pathologies cardiaques sont dédifférenciées en cellules souches pluripotentes (hiPSCs) à l'aide d'une transfection rétrovirale avec les gènes Myc, Oct4, Oct2, Sox-2 et Klf4. Ces cellules pluripotentes ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires dont les cardiomyocytes (Figure 21).

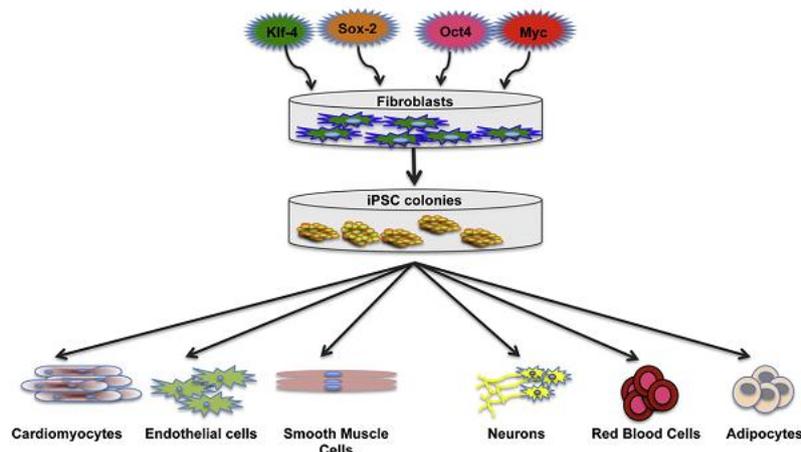


Figure 21 : Obtention des hiPSCs-CM à partir de fibroblastes humains

*Les fibroblastes, issus de patients sains ou atteints de pathologies, subissent une transfection rétrovirale avec les gènes Myc, Oct4, Oct2, Sox-2 et Klf4 pour se dédifférencier en cellules souches pluripotentes iPSCs. Ces iPSCs ont la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules somatiques, dont les cardiomyocytes (Nsair A *et al.*, 2011).*

La population de cardiomyocytes ainsi obtenue est hétérogène avec la présence de cellules atriales, ventriculaires et cellules « pacemaker » (cellules nodales responsables des battements du cœur). Les cardiomyocytes dérivés des hiPSCs (notés hiPSC-CMs) possèdent les caractéristiques génétiques des donneurs dont elles proviennent (donneurs sains ou atteints de pathologies cardiovasculaires) (Harris *et al*, 2013 ; Navarrete *et al*, 2013). Cette diversité génétique humaine représente un avantage majeur dans les étapes de développement *in vitro* d'un candidat médicament. En effet, il sera possible d'étudier l'effet de la molécule sur des cellules représentatives d'une large population.

Contrairement aux lignées cellulaires animales, les cellules hiPSC-CM expriment de manière constitutive les différents canaux ioniques cardiaques impliqués dans la genèse du potentiel d'action. Ces cellules ont ainsi été caractérisées d'un point de vue électrophysiologique : contractilité, genèse de potentiels d'action, expression des canaux ioniques, courants ioniques et cycle calcique (Tableau 10). Il a été observé que les potentiels d'action générés par les hiPSC-CMs sont principalement de type ventriculaire et sont similaires à ceux observés dans les cellules cardiaques fœtales immatures. Bien que les hiPSC-CMs expriment les gènes codant pour les principaux canaux ioniques impliqués dans la genèse du potentiel d'action, cette immaturité du profil du potentiel d'action s'explique par la faible expression de KCNJ2 responsable du courant I_{K1} .

Le courant I_{K1} généré par les hiPSC-CMs est beaucoup plus faible que celui généré par des cardiomyocytes humains matures.

Tableau 10 : Expression des canaux ioniques dans les hiPSC-CMs

Gène	Protéine	Courant	Expression
<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5	I_{Na}	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées
<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2	I_{CaI}	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées (surexpression dès le 21 ^{ème} jour de différenciation)
<i>CACNA1D</i>	Ca _v 1.3		
<i>KCNQ1</i>	K _v 7.1	I_{Ks}	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées
<i>KCNH2 (HERG)</i>	K _v 11.1	I_{Kr}	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées (surexpression dès le 21 ^{ème} jour de différenciation)
<i>HCN2</i>		I_f	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées (surexpression dès le 21 ^{ème} jour de différenciation)
<i>KCND3</i>	K _v 4.3	I_{to1}	Exprimé dans les hiPSC-CMs différenciées
<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	I_{K1}	Exprimé faiblement dans les hiPSC-CMs différenciées

Cette immaturité du profil du potentiel d'action représente une limite dans l'utilisation de ce modèle pour étudier l'impact de molécules pro-arythmiques touchant d'autres canaux que le canal potassique hERG.

Bien que prometteurs, ces modèles doivent faire l'objet d'études approfondies de validation, d'optimisation et de standardisation afin de pouvoir être pleinement intégrés aux études d'évaluation préclinique de la sécurité cardiovasculaire (Kraushaar *et al*, 2012).

V) Stratégie de développement de détection précoce de la toxicité cardiovasculaire des candidats médicaments

Bien que la stratégie actuelle d'évaluation de la sécurité cardiovasculaire des candidats médicaments soit efficace, elle présente certaines limites telles que l'extrapolation non totale des résultats issus des modèles *in vivo* actuels à ceux observés en phase clinique chez l'homme à cause des différences inter-espèces des récepteurs et des voies de signalisation impliquées (Khan *et al*, 2013). Par ailleurs, il est important de noter que les études *in vivo* sont majoritairement réalisées sur des jeunes animaux sains qui ne reflètent pas l'hétérogénéité de la population en clinique (Laverty *et al*, 2011). Il est également établi que l'étude de l'intervalle QT est un paramètre sensible mais non spécifique du risque pro-arythmique en phase clinique (Khan *et al*, 2013 ; Sager *et al*, 2014). Enfin, la stratégie préclinique actuelle d'évaluation de la cardiotoxicité ne permet pas de détecter l'intégralité des effets indésirables cardiaques associés aux molécules, suggérant ainsi le besoin de développer des modèles précliniques plus prédictifs.

Face aux besoins actuels en matière de sécurité cardiovasculaire, cette dernière fait l'objet de coopérations actives entre industriels, académiques et autorités sanitaires. L'objectif principal est de déterminer les domaines de la sécurité cardiovasculaire préclinique et clinique qui nécessitent une meilleure connaissance et compréhension afin d'envisager une nouvelle stratégie d'évaluation du risque cardiovasculaire. Par ailleurs, des recherches sont mises en place afin d'identifier des biomarqueurs translationnels de la toxicité cardiovasculaire (troponine, contractilité cardiaque, etc.) et d'envisager leur utilisation en routine dans les études précliniques.

Dans le cadre de ces challenges, les laboratoires doivent améliorer leurs capacités à détecter les effets cardiovasculaires de leurs candidats médicaments, et ceci le plus tôt possible dans le processus de développement. C'est pourquoi des stratégies d'évaluation précoce du risque cardiovasculaire, appelées études de pharmacologie de sécurité exploratoire, sont mises en place avant les études de pharmacologie de sécurité réglementaires qui sont lourdes et arrivent tardivement dans le développement des produits.

Cette détection précoce des effets indésirables cardiovasculaires des candidats permet de diminuer les ressources utilisées (notamment les animaux) et d'assurer une meilleure sécurité des patients en phase clinique.

Les études de pharmacologie de sécurité exploratoire regroupent des méthodes *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* qui sont mises en place dès la découverte d'une série chimique jusqu'à la sélection finale d'un candidat médicament (Figure 22). Ainsi, les données issues de ces études permettent de sélectionner et d'optimiser les molécules les plus intéressantes d'un point de vue chimique, pharmacologique, pharmacocinétique et toxicologique (« lead selection » et « lead optimization »). Dans un premier temps, une modélisation *in silico* ainsi qu'un profil d'interactions réceptorielles sont réalisés afin d'obtenir un premier profil de sécurité général et d'identifier les éventuels risques du produit associé à une interaction avec une ou plusieurs cibles impliquées dans la sécurité cardiovasculaire (canal hERG, récepteurs adrénergiques ou sérotoninergiques, COX, etc.). Des études *in vitro* et *ex vivo* sont ensuite réalisées sur les molécules présentant le meilleur profil de sécurité cardiovasculaire dans le but d'étudier, de manière intégrée et à l'échelle cellulaire ou tissulaire, les interactions précédemment observées. Ces études peuvent également révéler de nouveaux effets non détectés jusqu'à présent.

Ainsi, un profil d'interactions réceptorielles positif entre une molécule et les canaux cardiaques (calciques, sodiques et potassiques) peut être davantage étudié au moyen d'une étude sur fibre de Purkinje. Le potentiel d'action obtenu permet ainsi d'avoir une vision intégrée de ces différentes interactions et de voir leur impact sur la fonction cardiaque. Les données issues de ces études *in vitro* et *ex vivo* permettent le calcul de marges de sécurité et la sélection de candidats médicaments au profil de sécurité satisfaisant qui feront l'objet d'études *in vivo*. Ces études précoces chez l'animal permettent d'observer l'ensemble des effets d'une molécule à l'échelle d'un organisme entier vivant, intégrant ainsi l'ensemble des voies de signalisation et de régulation physiologiques. A la différence des modèles *in vitro* qui ne peuvent étudier que les effets de la molécule mère, les modèles *in vivo* permettent d'évaluer les effets d'une molécule mère mais également de ses métabolites tout en intégrant les phénomènes d'ADME. Dans ces études précoces, un petit nombre d'animaux est utilisé et l'espèce choisie doit être la plus métaboliquement proche de l'homme. La mise en place de ces études exploratoires permet ainsi de statuer sur le développement des molécules et d'anticiper la recherche de produits mieux tolérés.

Par ailleurs, identifier un risque cardiovasculaire le plus en amont possible du développement permet d'aider les chimistes à concevoir des substances les moins affines possibles pour les différentes cibles du système cardiovasculaire. Lorsque l'ensemble de cette batterie de tests exploratoires est terminé, les laboratoires sélectionnent la (les) molécule(s) la (les) plus prometteuse(s) et débutent les études réglementaires exigées par ICH S7A et ICH S7B. Les doses employées dans ces études auront été préalablement choisies grâce aux précieuses informations issues des études exploratoires (expositions, effets indésirables, etc.).

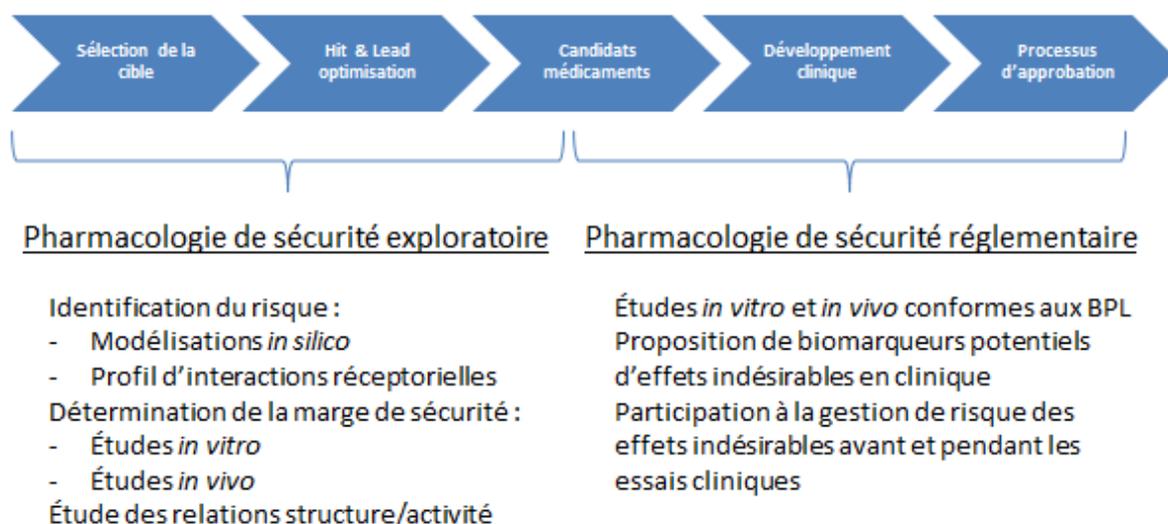


Figure 22 : Etudes de pharmacologie de sécurité exploratoires et réglementaires pour la sélection et le développement de médicaments

Il est intéressant de noter que les études de profil d'interactions réceptorielles occupent une place majeure dans les stratégies précoces d'évaluation du risque cardiovasculaire de pharmacologie de sécurité et de toxicologie. En effet, ces données peuvent être exploitées et être utiles à chaque étape du développement d'un produit (Bowes *et al*, 2012). Lors des phases précoces de recherche, le profil d'interactions réceptorielles permet d'identifier les dangers et d'étudier l'affinité d'une série chimique avec un panel de cibles principales impliquées dans la sécurité cardiovasculaire. Grâce à ce profil, les chimistes peuvent jouer sur les relations structure/activité du produit afin de diminuer, voire de supprimer ou au contraire d'augmenter son affinité pour certaines cibles, et ce bien en amont de la sélection du candidat final. En outre, les résultats obtenus permettront d'orienter les designs des études *in vivo* envisagées.

Lors des phases plus tardives du développement, les résultats du profil d'interactions réceptorielles peuvent être comparés aux éventuels effets observés lorsque l'animal est exposé à la concentration plasmatique thérapeutique. Par ailleurs, un profil d'interactions réceptorielles supplémentaire peut être mené sur un panel plus précis de cibles afin de mieux comprendre les mécanismes des effets observés *in vivo*. Enfin, les données issues du profil d'interactions réceptorielles peuvent être utilisées dans le plan de gestion des risques des patients en phase clinique. En conclusion, outre sa capacité à étudier l'efficacité des candidats médicaments, le profil d'interactions réceptorielles permet d'évaluer la marge de sécurité de ces derniers et de déterminer en partie leur développement. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que le profil d'interactions réceptorielles le plus complet ne pourra couvrir que 1,5 % du génome humain total et ne pourra donc pas prédire d'une sécurité absolue (Bowes *et al*, 2012).

Comme évoqué ci-dessus, les études de pharmacologie de sécurité exploratoires quantifient le risque d'un produit en calculant une marge de sécurité pour un effet indésirable donné. Celle-ci correspond au ratio entre l'exposition maximale (correspondant à la concentration maximale plasmatique, C_{max}) à la NOAEL et la C_{max} à la dose pharmacologiquement active (Muller & Milton, 2012). Cette marge peut être révisée en considérant d'autres facteurs (classe thérapeutique, métabolisme, fraction libre plasmatique, résultats des études de toxicologie générale...). Ainsi, plus le candidat médicament avancera dans le développement, plus sa marge de sécurité sera affinée par les résultats issus tout d'abord des études précliniques *in vitro*, puis des études précliniques *in vivo* et enfin des études cliniques (Figure 23). Il est important de noter que, en plus des données de sécurité, des données sur l'efficacité du produit sont prises en compte dans l'évaluation de son index thérapeutique.

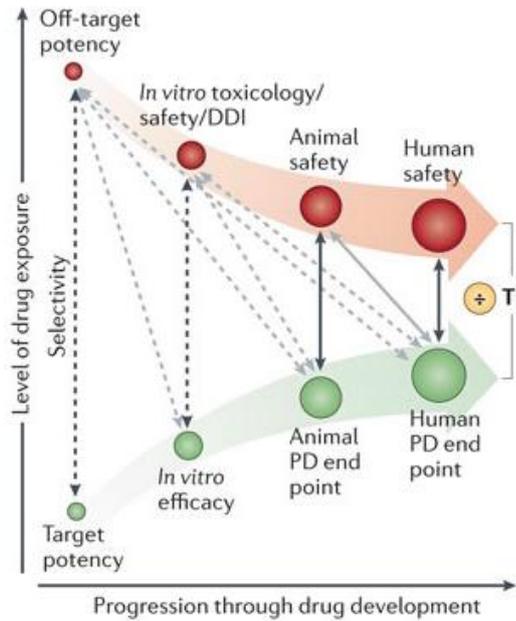


Figure 23 : Détermination de l'index thérapeutique dans le développement d'un médicament
 Les données de sécurité (ronds rouges) et les données d'efficacité (ronds verts) augmentent tout au long du développement du médicament, du profil d'interactions réceptorielles jusqu'aux études cliniques. Les index thérapeutiques sont calculés en faisant le ratio du C_{max} à la NOAEL et le C_{max} de la dose pharmacologique (Muller & Milton, 2012).

DDI = drug-drug interaction, PD = pharmacodynamic, TI = therapeutic indice

VI) Discussion

La sécurité cardiovasculaire des médicaments constitue une préoccupation majeure en termes de santé publique. En effet, de très nombreuses molécules sont susceptibles d'entraîner divers effets indésirables cardiovasculaires (hypo/hypertensions, arythmies, insuffisances cardiaques, ischémies, etc.) de par leur interaction avec les composants du système cardiovasculaire. Ces effets sont d'autant plus préoccupants que beaucoup de patients présentent des facteurs de risque cardiovasculaires préexistants (obésité, diabète, tabagisme, etc.). C'est pourquoi les molécules développées doivent être les plus exemptes possible d'effets indésirables cardiovasculaires.

Face à l'importante prévalence de ces effets indésirables cardiovasculaires, les laboratoires ont mis en place des stratégies précliniques d'évaluation de la sécurité cardiovasculaire médiées par des lignes directrices de toxicologie (ICH M3) et de pharmacologie de sécurité (ICH S7A et S7B). Ces études permettent d'étudier d'une part la toxicité structurelle et les organes cibles des candidats médicaments, et d'autre part leurs effets indésirables fonctionnels.

Néanmoins, face à l'arrivée tardive de ces stratégies réglementaires dans le processus de développement des médicaments, les laboratoires ont mis en place des stratégies précoces d'évaluation du risque cardiovasculaire permettant d'avoir une vision intégrée de l'effet d'une molécule sur le système cardiovasculaire. Ces stratégies intègrent des modèles *in silico* souvent issus de la recherche interne du laboratoire mais dont les validations sont en cours, c'est pourquoi leurs résultats doivent être considérés avec précaution. Des modèles *in vitro* sur cellules sont également utilisés tels que le « binding » et le patch clamp (automatique ou manuel). Ces études permettent d'établir le profil d'interactions réceptorielles d'un produit et d'évaluer ses effets cardiovasculaires à travers notamment la mesure des interactions cibles-ligands. Ces études de profil d'interactions réceptorielles ont un rôle majeur dans l'évaluation de la sécurité cardiovasculaire des candidats médicaments car elles permettent d'identifier précocement les interactions pharmacologiques « off-target » (interactions de la molécule avec des sites d'action qui nécessitent des investigations approfondies en termes de sécurité) pouvant impacter les études *in vivo* et cliniques.

Les modèles *ex vivo* tissulaires, tels que la fibre de Purkinje et le cœur isolé de Langendorff, ont également un rôle majeur dans la stratégie préclinique d'évaluation du risque cardiovasculaire associé aux interactions avec les canaux ioniques cardiaques. Ces études permettent d'avoir une vision plus intégrée de l'effet d'une molécule sur le système cardiaque par rapport aux études *in vitro*. Ces études *in silico*, *in vitro* et *ex vivo* permettent ainsi de sélectionner les molécules au profil de sécurité satisfaisant, qui seront ensuite soumises à des études *in vivo* chez l'animal télémétré et anesthésié.

A la différence des études *in vitro*, les études *in vivo* présentent l'avantage de pouvoir étudier les effets des métabolites d'une substance et d'intégrer les phénomènes d'ADME. C'est une qualité non négligeable, notamment pour les molécules prodrug telles que la terfénadine. En effet, la terfénadine est une prodrug métabolisée en une forme active (féxofénadine) par le cytochrome hépatique CYP450 de type 3A4. La terfénadine est cardiotoxique de par son interaction avec le canal potassique hERG, tandis que la féxofénadine ne l'est pas. Dans ce cas précis, les modèles *in vivo* ont permis de démontrer que l'administration de terfénadine n'entraîne pas de cardiotoxicité majeure dans les conditions où sa métabolisation n'est pas altérée.

Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la pharmacocinétique peut être différente entre l'animal et l'homme (ex : le taux d'absorption et les métabolites peuvent différer), c'est pourquoi les modèles *in vivo* ne sont pas d'une prédictivité absolue des effets potentiellement observés en phase clinique.

Ainsi, l'ensemble de ces études de pharmacologie de sécurité, réalisées en parallèle d'études d'efficacité et de pharmacodynamie, permettent d'affiner le profil de sécurité du produit ainsi que sa marge thérapeutique tout au long du développement.

A travers ces différents modèles, les études de toxicologie et de pharmacologie de sécurité se révèlent ainsi complémentaires en permettant une évaluation préclinique à la fois fonctionnelle et structurelle des effets indésirables cardiovasculaires d'un produit.

L'un des points forts de ces stratégies précoces est que celles-ci permettent une meilleure sélection des candidats médicaments en phase préclinique et donc une meilleure sécurité des patients en phase clinique. En outre, le faible nombre d'animaux utilisés dans ces études permet de respecter le principe éthique de la règle des 3Rs qui vise à Réduire, Raffiner, et Remplacer l'usage des modèles *in vivo*.

Enfin, d'un point de vue financier, ces études exploratoires permettent une économie de temps et d'argent pour les laboratoires qui statuent rapidement sur le développement de leurs produits, permettant ainsi de stimuler la recherche de nouvelles molécules. Plus vite le laboratoire détectera les effets indésirables sur ses candidats médicaments, plus vite il pourra écarter les molécules au profil de sécurité peu satisfaisant pour, *in fine*, réorienter sa recherche et ses moyens sur de nouvelles molécules.

Néanmoins, ces stratégies précoces de pharmacologie de sécurité présentent des limites. Tout d'abord, les modèles actuels d'évaluation du risque cardiovasculaire sont prédictifs, mais cette prédictivité n'est pas absolue du fait des différences métaboliques et physiologiques inter-espèces. Par ailleurs, il est aujourd'hui impossible de détecter les effets indésirables cardiovasculaires faisant suite à un traitement chronique, une association médicamenteuse ou qui ont une faible incidence en phase clinique.

Ces différents points sont des défis à relever pour les laboratoires pharmaceutiques qui se tournent aujourd'hui vers des méthodes leur permettant d'évaluer l'intégralité des mécanismes toxiques pouvant altérer le système cardiovasculaire. Par ailleurs, d'un point de vue cardiaque, les laboratoires souhaitent détecter avec précision les altérations à la fois électrophysiologiques et structurelles du tissu cardiaque pouvant être à l'origine de pathologies (cardiomyopathies, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde). C'est dans cet objectif que les études de pharmacologie de sécurité précoces sont en perpétuelle évolution, avec le développement de nouveaux modèles plus prédictifs permettant de générer rapidement et en temps réel des données pertinentes (modélisations *in silico* perfectionnées, cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines, etc.). Une attention particulière est aujourd'hui accordée aux marqueurs biologiques translationnels les plus prédictifs de la réponse humaine en phase clinique. Ces derniers doivent être spécifiques et sensibles par rapport à un effet toxique donné et doivent permettre d'extrapoler les réponses obtenues *in vivo* chez l'animal en phase préclinique à celles attendues chez l'homme en phase clinique. Actuellement, la troponine et l'échocardiographie sont des biomarqueurs validés dans la sécurité cardiovasculaire mais ils ne sont pas réalisés en routine.

D'autres biomarqueurs plus récents font aujourd'hui l'objet de recherches actives, notamment les microARN (miARN). Il s'agit de petites séquences d'ARN non-codantes, simple brin, d'environ 22 nucléotides, ayant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ils sont issus de la transcription de régions d'ADN dans le noyau cellulaire (pré-miARN), puis ils subissent un processus de clivage de Dicer (enzyme à activité RNase) dans le cytosol aboutissant aux microARN matures. Ces molécules sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques, associés notamment à certaines pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'insuffisance cardiaque, l'ischémie, l'hypertension et les arythmies (Romaine *et al*, 2015). Les microARN sont présents dans la circulation sanguine sous une forme stable et protégée de l'activité RNase endogène (Mitchell *et al*, 2008). Ils possèdent l'avantage de voir leur concentration sanguine varier de manière importante et précoce lors d'évènements toxiques ce qui leur confère aujourd'hui le statut de biomarqueur potentiel d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque (Campion *et al*, 2013 ; Romaine *et al*, 2015 ; Mitchell *et al*, 2008).

En outre, grâce aux avancées technologiques dans le domaine des « omics » (génomique, protéomique, métabolomique), de nouveaux marqueurs translationnels sont activement recherchés (Raschi *et al*, 2010 ; Pujol *et al*, 2010). Ainsi, la métalloprotéinase 1 apparaît comme un marqueur précoce et sensible des altérations vasculaires causées par les inhibiteurs de phosphodiesterases 4 dans le traitement de l'asthme ou des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (Turteltaub *et al*, 2011).

Il est évident qu'aucun des nouveaux modèles envisagés (hiPSC-CM, modélisations *in silico*) ne pourra remplacer entièrement le modèle animal et que les biomarqueurs translationnels devront faire l'objet de nombreuses recherches avant de pouvoir être intégrés complètement en routine dans les stratégies précoces d'évaluation du risque cardiovasculaire. À terme, la validation de ces modèles et biomarqueurs apparaît comme une révolution dans l'évaluation préclinique du risque cardiovasculaire et le développement des médicaments, avec une identification et une compréhension plus complète et plus précoce des effets indésirables cardiovasculaires. Cela permettrait ainsi d'assurer une meilleure sécurité au patient et de diminuer le taux d'attrition des molécules lors des phases tardives du développement.

Bibliographie

Abassi YA, Xi B, Li N, Ouyang W, Seiler A, Watzele M, Kettenhofen R, Bohlen H, Ehlich A, Kolossov E, Wang X, Xu X. (2012). Dynamic monitoring of beating periodicity of stem cell-derived cardiomyocytes as a predictive tool for preclinical safety assessment. *Br J Pharmacol.* 165(5):1424-41.

Aggarwal R, Prakash O, Medhi B. (2006). Drug Induced Potential Torsades de Pointes. *JK Scienc.* 8(4):185-189.

Amuzescu B, Scheel O, Knott T. Novel automated patch clamp assays on stem-cell derived cardiomyocytes : will they standardize in vitro pharmacology and arrhythmia research? (2014). *J Phys Chem Biophys.* 4:153.

Ardehall A & Ports TA. (1990). Myocardial oxygen supply and demands. *Chest.* 98(3):699-705.

Arnold AC & Shibao C. (2013). Current concepts in orthostatic hypotension management. *Curr Hypertens Rep.* 15(4):304–312.

Babuian L & Jaffe AS. (2005). Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ.* 173(10):1191-202.

Bajracharya O, Shankar PR, Jha N. (2015). Cardiovascular Toxicity of Noncardiovascular Drugs. *Heart and Toxins.* 305-339.

Berridge BR, Pettit S, Walker DB, Jaffe AS, Schultze AE, Herman E, Reagan WJ, Lipshultz SE, Apple FS, York MJ. (2009). A translational approach to detecting drug-induced cardiac injury with cardiac troponins: Consensus and recommendations from the Cardiac Troponins Biomarker Working Group of the Health and Environmental Sciences Institute. *Am Heart J.* 158(1):21-9.

Bhatt S, Foote S, Smith A, Butler P, Steidl-Nichols J. (2015). A non-human primate model for investigating drug-induced risk of orthostatic hypotension and sympathetic dysfunction: Preclinical correlate to a clinical test. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 73: 49-55.

Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 343:1520-1528.

Bowes J, Brown AJ, Hamon J, Jarolimek W, Sridhar A, Waldron G, Whitebread S. (2012). Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat Rev Drug Discov.* 11(12):909-22.

Braverman AC, Antin JH, Plappert MT, Cook EF, Lee RT. (1991). Cyclophosphamide cardiotoxicity in bone marrow transplantation: a prospective evaluation of new dosing regimens. *J Clin Oncol.* 9(7):1215-23.

Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanasa A, Konstam MA, Baron JA. (2005). Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 352:1092-1102.

Campion S, Aubrecht J, Boekelheide K, Brewster DW, Vaidya VS, Anderson L, Burt D, Dere E, Hwang K, Pacheco S, Saikumar J, Schomaker S, Sigman M, Goodsaid F. (2013). The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 9(11):1391-408.

Cavero I. (2009). 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.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. (2003). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 42(6):1206-52.

Choueiri TK, Schutz FA, Je Y, Rosenberg JE, Bellmunt J. (2010). Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Clin Oncol.* 28(13):2280-5.

Cohen JD, Babiarz JE, Abrams RM, Guo L, Kameoka S, Chiao E, Taunton J, Kolaja KL. (2011). Use of human stem cell-derived cardiomyocytes to examine sunitinib mediated cardiotoxicity and electrophysiological alterations. *Toxicol Appl Pharmacol.* 257(1):74-83.

Cools F, Dhuyvetter D, Vanlommel A, Janssens S, Borghysa H, Geys H, Gallacher JD. (2014). A translational assessment of preclinical versus clinical tools for the measurement of cardiac contractility: Comparison of LV dP/dtmax with echocardiography in telemetry implanted beagle dogs. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 69(1):17-23.

Declerck, J. Étude de la dynamique cardiaque par analyse d'images tridimensionnelles. Thèse de l'université de Nice Sophia-Antipolis, 1997.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM. (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356(2):125-34.

Esposito A, Gelao L, Criscitiello C, Curigliano G. (2015). Cardiovascular Toxicity from Chemotherapy and Anticancer Treatment. *Heart and Toxins.* 341-361.

European Medicines Agency (EMA). ICH topic S7A: « Safety Pharmacology studies for Human Pharmaceuticals ».

Ewer MS, Vooletich MT, Benjamin RS. (2004). A mathematical model for doxorubicin cardiotoxicity: added evidence for the concept of sequential stress. *J Clin Oncol.* 22(14S Suppl 15):2004-2086.

- Fine, SR., & Ginsberg, P. (2008). Alpha-adrenergic receptor antagonists in older patients with benign prostatic hyperplasia: Issues and potential complications. *J Am Osteopath Assoc.* 108(7):333-7.
- Freeman R, Wieling W, Axelrod FB, Benditt DG, Benarroch E, Biaggioni I, Cheshire WP, Chelimsky T, Cortelli P, Gibbons CH, Goldstein DS, Hainsworth R, Hilz MJ, Jacob G, Kaufmann H, Jordan J, Lipsitz LA, Levine BD, Low PA, Mathias C, Raj SR, Robertson D, Sandroni P, Schatz I, Schondorff R, Stewart JM, van Dijk JG. (2011). Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, neurally mediated syncope and the postural tachycardia syndrome. *Clin Auton Res.* 21(2):69-72.
- Frickhofen N, Beck FJ, Jung B, Fuhr HG, Andrasch H, Sigmund M. (2002). Capecitabine can induce acute coronary syndrome similar to 5-fluorouracil. *Ann Oncol.* 13(5):797-801.
- Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Lluch A, Zambetti M, Sabadell D, Raab G, Cussac AL, Bozhok A, Martinez-Agulló A, Greco M, Byakhov M, Lopez JJ, Mansutti M, Valagussa P, Bonadonna G. (2009). Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy. *J Clin Oncol.* 27(15):2474-81.
- Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rapoport JM. (1986). Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. *Blood.* 68(5):1114-8.
- Gradishar WJ, Vokes EE. (1990). 5-Fluorouracil cardiotoxicity: a critical review. *Ann Oncol.* 1(6):409-14.
- Grenier MA, Lipshultz SE. (1998). Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol.* 25(4 Suppl 10):72-85.
- Grossman E & Messerli FH. (2012). Drug-induced hypertension: an unappreciated cause of secondary hypertension. *Am J Med.* 125(1):14-22.
- Guo L, Abrams RM, Babiarz JE, Cohen JD, Kameoka S, Sanders MJ, Chiao E, Kolaja KL. (2011). Estimating the risk of drug induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Sci.* 123(1):281-9.
- Guo L, Coyle L, Abrams RM, Kemper R, Chiao ET, Kolaja KL. (2013). Refining the human iPSC-cardiomyocyte arrhythmic risk assessment model. *Toxicol Sci.* 136(2):581-94.
- Guo L, Dong Z, Guthrie H. (2009). Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 60(2):130-51.
- Harris K, Aylott M, Cui Y, Louttit JB, McMahon NC, Sridhar A. (2013). Comparison of electrophysiological data from human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes to functional preclinical safety assays. *Toxicol Sci.* 134(2):412-26.
- Hirsh J. (2007). Risk of thrombosis with lenalidomide and its prevention with aspirin. *Chest.* 131(1):275-7

Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Zietse R, Unwin RJ, Ellison DH. (2012). Pathogenesis of calcineurin inhibitor–induced hypertension. *J Nephrol.* 25(3):269-75.

Huang XP, Setola V, Yadav PN, Allen JA, Rogan SC, Hanson BJ, Revankar C, Robers M, Doucette C, Roth BL. (2009). Parallel functional activity profiling reveals valvulopathogens are potent 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor agonists: implications for drug safety assessment. *Mol Pharmacol.* 76(4):710–722.

Institute of Medicine. (2009). *Accelerating the Development of Biomarkers for Drug Safety: Workshop Summary.* Washington, DC: The National Academies Press.

Jonsson MK, Wang QD, Becker B. (2011). Impedance based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes. *Assay Drug Dev Technol.* 9(6):589-99.

Kamaruzzaman S, Watt H, Carson C, Ebrahim S. (2010). The association between or-thostatic hypotension and medication use in the British Women's Heart and Health Study. *Age Ageing.* 39(1):51-6.

Kamba T & McDonald DM. (2007). Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *J Cancer.* 96(12):1788-95.

Khan JM, Lyon AR, Harding SE. (2013). The case for induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes in pharmacological screening. *Br J Pharmacol.* 169(2):304-17.

Korff S, Katus HA, Giannitsis E. (2006). Differential diagnosis of elevated troponins. *Heart* 92(7):987–993.

Kraushaar U, Meyer T, Hess D, Gepstein L, Mummery CL, Braam SR, Guenther E. (2012). Cardiac safety pharmacology : from human ether-a-gogo related gene channel block towards induced pluripotent stem cell based disease model. *Expert Opin Drug Saf.* 11(2):285-98.

Lavery HG, Benson C, Cartwright EJ, Cross MJ, Garland C, Hammond T, Holloway C, McMahon N, Milligan J, Park BK, Pirmohamed M, Pollard C, Radford J, Roome N, Sager P, Singh S, Suter T, Suter W, Trafford A, Volders PGA, Wallis R, Weaver R, York M, Valentin JP. (2011). How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines. *Br J Pharmacol.* 163(4):675–693.

Leung JY, Barr AM, Procyshyn RM, Honer WG, Pang CC. (2012). Cardiovascular side-effects of antipsychotic drugs: The role of the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther.* 135(2):113-22.

Markert M, Trautmann T, Gross M, Ege A, Mayer K, Guth B. (2012). Evaluation of a method to correct the contractility index LV dP/dtmax for changes in heart rate. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 66(2):98-105.

Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 357(26):2666-76.

Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. (2005). Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(4):792-9.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(30):10513-8.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356(2):115-24.

Mourad JJ & Levy BI. (2011). Mechanisms of antiangiogenic-induced arterial hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 13(4):289-93.

Muller PY & Milton MN. (2012). The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):751-61.

Munos B. (2009). Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov.* 8:959-968.

Navarrete EG, Liang P, Lan F, Sanchez-Freire V, Simmons C, Gong T, Sharma A, Burrige PW, Patlolla B, Lee AS, Wu H, Beygui RE, Wu SM, Robbins RC, Bers DM, Wu JC. (2013). Screening drug induced arrhythmia using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays. *Circulation.* 128(11 Suppl 1):S3-13.

Nsair A & MacLellan WR. (2011). Induced pluripotent stem cells for regenerative cardiovascular therapies and biomedical discovery. *Adv Drug Deliv Rev.* 63(4-5): 324–330.

O'Brien PJ. (2006). Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: archetype of a translational safety biomarker. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6(5):685– 702.

O'Brien PJ. (2008). Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 245 (3):206–218.

Ottervanger JP, Wilson JHP, Stricker BHC. (1997). Drug-induced chest pain and myocardial infarction. Reports to a National Centre and Review of the Literature. *Eur J Clin Pharmacol.* 53(2):105-110.

Picard S, Goineau S, Guillaume P, Henry J, Hanouz JL, Rouet R. (2011). Supplemental studies for cardiovascular risk assessment in safety pharmacology: A critical overview. *Cardiovasc Toxicol.* 11(4):285-307.

Pointon A, Abi-Gerges N, Cross MJ, Sidaway JE. (2013). Phenotypic profiling of structural cardiotoxins in vitro reveals dependency on multiple mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci.* 132(2):317-26

Potacova A, Adamcova M, Cajnakova H, Hrbatova L, Sterba M, Popelova O, Simunek T, Ponka P, Gersl V. (2007). Evaluation of ECG time intervals in a rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: a useful tool for assessment of cardioprotective agents. *Physiol. Res.* 56:251-254.

Pugsley MK, Towart R, Authier S, Gallacher DJ, Curtis MJ. (2011). Innovation in safety pharmacology testing. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 64(1):1-6.

Pujol A, Mosca R, Farres J, Aloy P. Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 31(3):115-23.

Raschi E, Vasina V, Ursino MG, Boriani G, Martoni A, De Ponti F. (2010). Anticancer drugs and cardiotoxicity: insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Ther.* 125(2):196-218.

Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. (2003). Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res.* 58(1):32-45.

Redfern WS, Ewart L, Hammond TG, Bialecki R, Kinter L, Lindgren S. (2010). Impact and frequency of different toxicities throughout the pharmaceutical life cycle. *Toxicologist* 114, 1081.

Rini BI, Cohen DP, Lu DR, Chen I, Hariharan S, Gore ME, Figlin RA, Baum MS, Motzer RJ. (2011). Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst.* 103(9):763-73.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. (2015). Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 36(6):326-48.

Rodeghiero F & Elice F. (2003). Thalidomide and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(Suppl 1):15–18.

Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. (2015). Micro RNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart.* 0:1-8.

Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, Roth BL. (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation.* 102(23):2836-41.

Sager P, Heilbraun J, Turner JR, Gintant G, Geiger MJ, Kowey PR, Mansoor GA, Mendzelevski B, Michelson EL, Stockbridge N, Weber MA, White WB. (2013). Assessment of drug-induced increases in blood pressure during drug development: Report from the Cardiac Safety Research Consortium. *Am Heart J.* 165(4): 477-488.

- Sager PT, Gintant G, Turner JR, Pettit S, Stockbridge N. (2014). Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *American Heart Journal*. 167(3):292–300.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E. & Keating, M. T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. 81(2):299-307.
- Sarazan RD, Kroehle JP, Main BW. (2012). Left ventricular pressure, contractility and dP/dtmax in nonclinical drug safety assessment studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 66(2):71-8.
- Sarazan RD, Mittelstadt S, Guth B, Koerner J, Zhang J, Pettit S. (2011). Cardiovascular function in Nonclinical drug safety assessment: Current issues and opportunities. *International Journal of Toxicology*. 30(3):272–286.
- Schutz FA, Je Y, Richards CJ, Choueiri TK. (2012). Meta-analysis of randomized controlled trials for the incidence and risk of treatment-related mortality in patients with cancer treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol*. 30(8):871-7.
- Shah, RR. (2006). Can pharmacogenetic help rescue drugs withdrawn from the market? *Pharmacogenomics*. 7(6):889-908.
- SHEP Cooperative Research Group. (1991). Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA*. 265(24):3255-64.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, Ponka P. (2005). Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol. Res*. 51(3); 223–231.
- Simunek, T., Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Sterba M, Hrdina R, Gersl V. (2004). Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur. J. Heart Fail*. 6(4):377–387.
- Tamargo J, Caballero R, Delpon E. Drug-induced atrial fibrillation: does it matter? *Discov Med*. 14(78):295-9.
- Textor SC, Taler SJ, Canzanello VJ, Schwartz L, Augustine JE. (2000). Post transplantation hypertension related to calcineurin inhibitors. *Liver Transpl*. 6(5):521-30.
- Think Tank Meeting FDA/CSRC/HESI/SPS. Rechannel the cardiac proarrhythmia safety paradigm: an update. Synopsis of the December 11th, 2014.
- VA Cooperative Research Group. (1970). Effects of treatment on morbidity in hypertension. II. Results in patients with diastolic blood pressure averaging 90 through 114 mmHg. *JAMA*. 213(7):1143-52.
- Vejpongsa P, Yeh ET. (2014). Prevention of anthracycline induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 64(9):938-45.

Verheul HM & Pinedo HM. (2007). Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer*. 7(6):475-85.

Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. (1979). Risk factors for doxorubicin induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*. 91(5):710-7.

Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, MacGregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD, York MJ. (2004). Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol*. 32(1):106-21.

White WB. Cardiovascular effects of the cyclooxygenase inhibitors. *Hypertension* (2007a). 49(3):408-18.

White WB, West CR, Borer JS, Gorelick PB, Lavange L, Pan SX, Weiner E, Verburg KM. (2007b). Risk of cardiovascular events in patients receiving celecoxib: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol*. 99(1):91–98.

Wittelas RM & Telli M. (2012). Underestimating cardiac toxicity in cancer trials: Lessons learned. *J Clin Oncol*. 30(16):1916–1918.

Yeh ETH & Bickford CL. (2009). Cardiovascular complications of cancer therapy: Incidence, pathogenesis, diagnosis and management. *Journal of American College of Cardiology*. 53(24):2231–2247.

Yuan Y, Bai X, Luo C, Wang K, Zhang H. (2015). The virtual heart as a platform for screening drug cardiotoxicity. *BJP*. 172(23) :5531-5547.

Université de Lille 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2015/2016

Nom : NOURRY

Prénom : SANDRA

Titre de la thèse : La cardiotoxicité des candidats médicaments :

Méthodes d'évaluation préclinique en pharmacologie de sécurité

Mots-clés : pharmacologie de sécurité, cardiotoxicité et toxicité cardiovasculaire, développement préclinique, screening, biomarqueurs

Résumé : La sécurité des médicaments constitue une préoccupation majeure pour tous les acteurs de la santé, avec une attention particulière portée à la toxicité cardiovasculaire. En effet, celle-ci représente l'une des principales causes d'attrition des molécules en développement, ainsi que du retrait du marché de molécules commercialisées. C'est dans ce contexte que la pharmacologie de sécurité a vu le jour dans le but d'étudier, au travers de modèles précliniques pertinents de la clinique humaine, les effets indésirables fonctionnels des candidats médicaments. Ces modèles sont basés sur l'évaluation, *in vitro* sur des cellules ou des tissus et *in vivo* chez l'animal, de l'interaction entre la molécule et les différentes cibles à impact cardiovasculaire (canaux ioniques cardiaques, récepteurs du système nerveux autonome, etc). Ils sont mis en place dès les stades les plus précoces du développement préclinique des médicaments afin de sélectionner les meilleurs candidats et donc d'assurer une meilleure sécurité des patients en clinique. En parallèle de ces stratégies, des recherches visent à caractériser des biomarqueurs qui permettront une meilleure translation du préclinique à la clinique humaine.

Membres du jury :

Président : GARCON Guillaume, Professeur des Universités (Toxicologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

Assesseur(s) : PLATEL Anne, Maître de Conférences (Toxicologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

TORDJMAN Charles, Docteur en Pharmacie, Directeur Pharmacologie de Sécurité, Institut de Recherches Servier

Membre(s) extérieur(s) : DURIEZ Patrick, Professeur des Universités (Physiologie), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, Université Lille 2

