

Direction des Métiers Scientifiques (DMS)
Pôle 3
Pôle Non-clinique, pharmacocinétique clinique
et interactions médicamenteuses
Personne en charge : Paul Houeto
Numéro du document : 20210512_CR_CSP_NC

Comité scientifique permanent Sécurité et qualité des médicaments - Formation restreinte non clinique

Séance du 12 mai 2021 de 14h à 17h00

Ordre du jour

Points	Sujets abordés	pour audition, information, adoption ou discussion
1.	Introduction	
1.2	Point sur les déclarations d'intérêts (DPI) et les situations de conflits d'intérêts	Pour information
2.	Dossiers thématiques	
2.1	Audition partie prenante : Sanofi	Pour discussion et avis
2.2	Organes sur puce : Analyse critique des données issues de la littérature	Pour discussion et avis

Participants

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
Membres			
DEBRUYNE Danièle		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GATTACCECA Florence		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GUERBET Michel		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GUILLEMAIN Joël		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PETITCOLLOT Nicole		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PICARD Roger		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Autres			
SANOFI	Partie prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SANOFI	Partie prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ANSM			

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
BARDIN-LAFORGE	Evaluateur	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
BURBANK Matthew	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FABRE Isabelle	Scientifique CTROL	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOUETO Paul	Référent non clinique DMS, Modérateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LAVERGNE Fabien	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LOUIN Gaelle	Chef de pôle 3 DMS	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MONIER Christine	Evaluateur	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MORCOS Athina	Stagiaire pôle 3 DMS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SALOMON Valérie	Directrice DMS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SANH Alan	Evaluateur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1. Introduction

1.1. Point sur les DPI et les situations de conflits d'intérêts

Tous les membres ont déclaré avoir complété leur DPI et n'ont pas à ce jour d'intérêt à déclarer notamment en lien avec cette thématique sur les organes sur puces.

Aucun lien n'a été identifié pour les membres et les experts

Lien(s) identifié(s)					
Dossier	Nom Prénom	Type de lien	Niveau de lien	Période	Si lien niveau 2
					Sorti <input type="checkbox"/>
					Absent <input type="checkbox"/>
					Présent <input type="checkbox"/>

Nom du dossier :

Numéro/type/nom du dossier	Méthodes alternatives : organes sur puces pour évaluer la toxicité et la pharmacocinétique des médicaments.
Laboratoire(s)	Sanofi
Direction produit concernée	Direction des Métiers Scientifiques (DMS)
Expert(s)	

1.2. Tour de table

Après avoir souhaité la bienvenue aux participants, le modérateur ouvre la séance.

Un tour de table des participants a été effectué.

1. Dossiers thématiques

L'agence se préoccupe des technologies d'organes sur puces. C'est dans ce cadre qu'elle souhaite anticiper et cherche à amorcer une réflexion autour de ce sujet relatif à ces technologies innovantes de culture cellulaire en 3D et en conditions dynamiques dans la chaîne de développement de nouveaux médicaments.

Cette réflexion ne saurait aboutir sans le concours de parties prenantes (grandes entreprises pharmaceutiques, CRO, start-up, ...) qui sont des acteurs majeurs et concrets, capables de nous informer sur l'évolution de ces technologies d'organes sur puces.

Objectif

Cette quatrième séance de travail vise à auditionner une partie prenante, en l'occurrence la société Sanofi, qui a une expérience dans le développement de système d'organes sur puces.

Cette séance de travail est aussi consacrée à la restitution des travaux effectués par Madame Athina Morcos, stagiaire à l'ANSM pour compléter les investigations menées par les experts lors des précédents groupes de travail.

Ce recueil des travaux permettra d'identifier les points critiques de telles données dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché ou d'un essai clinique et d'élaborer le cas échéant des recommandations correspondantes.

La finalité de ce travail est d'élaborer une doctrine d'évaluation des technologies d'organes sur puce dans le processus de développement d'un candidat médicament.

1.1. Audition partie prenante

La société Sanofi a été associée à la réflexion par le biais de questions sur leur propre expérience de mise en œuvre de ces technologies, les verrous éventuels et les avancées majeures dans le domaine, afin de nous permettre de mieux appréhender les points ci-dessous :

- Quel est l'état des lieux de la recherche actuelle ?
- Les modèles existants à savoir :
 - o Les principaux modèles hépatiques
 - o Les autres modèles d'organes
 - o Les modèles associant plusieurs organes
 - o Les domaines d'application
- Les avantages et les limites de ces systèmes
- Existe-t-il un consensus sur des modèles validés ?
- Les futurs projets
- Les bénéfices apportés par l'intégration de ces technologies : quel impact sur l'expérimentation animale ?
- Quelles sont les molécules pharmaceutiques testées ou susceptibles d'être testées ?
- Ces modèles ont-ils permis de prédire des toxicités *in vivo* en particulier chez l'homme, non décelées avec les modèles *in vitro* classiques ?
- Ces technologies sont-elles utilisées en routine ou uniquement à des fins de recherche ?
- Quels sont les autres systèmes de couplage, par exemple la modélisation PBPK ou les approches « omics » ?.

Présentation

Les systèmes organotypiques peuvent être de plusieurs types :

- Les organoïdes sont des systèmes cellulaires en 3D auto-organisés, constitués de cellules souches ou de cultures cellulaires primaires issues de tissus humains ou animaux.
- Les organes sur puces (« Organ on a chip » ou OoC) sont des cultures de différentes cellules primaires humaines ou animales, lignées cellulaires ou cellules dérivées de cellules souches isolées ou encore associées (multi-cellulaires) cultivées en milieu dynamique souvent en présence d'une matrice extracellulaire.

Ces derniers également connus sous le terme de systèmes microphysiologiques (MPS) sont des systèmes *in vitro* qui ont pour but de reproduire au plus près la physiologie *in vivo*. Ils offrent la possibilité de cultiver plusieurs types cellulaires en 2D ou en 3D tout en incorporant la dynamique au sein du système via soit une pompe péristaltique, soit par flux gravimétrique, et ce, afin de reproduire les contraintes de cisaillement ou « shear stress » auxquels l'organe est exposé lorsqu'il est perfusé.

Les OoC permettent, entre autres, l'étude de mécanismes ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion), de toxicologie et de prédire les phénomènes d'interactions médicamenteuses. Ces systèmes sont généralement utilisés comme des outils d'aide à la décision lorsque les systèmes 2D ne sont pas assez performants, permettant ainsi d'avoir une meilleure corrélation *in vivo/in vitro*.

Ils permettent notamment d'allonger les durées de culture et donc d'incubation. En effet, des hépatocytes ou certains types de neurones cultivés en 2D conservent leurs capacités métaboliques, phénotypiques ou de communication pendant 2/3 jours maximum alors qu'en systèmes 3D ou 3D/microfluidiques, ils restent viables pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines.

Les caractéristiques clés pour la sélection de systèmes MPS pertinents pour les applications ADME ou de la toxicologie sont principalement les suivantes :

- Être de taille raisonnablement importante avec suffisamment de milieu d'incubation pour pouvoir faire de l'échantillonnage à plusieurs reprises sans affecter le système,

- Contenir une quantité suffisante de cellules pour permettre une bonne métabolisation (par exemple des entités chimiques dans le cas de la prédiction de la clairance intrinsèque métabolique), et une bonne communication intercellulaire (par exemple dans le cas des neurones).
- Présenter une évaporation limitée,
- Être fabriquées dans un matériau non-adsorbant de manière à limiter la fixation non-spécifique des composés testés en particulier ceux présentant une forte lipophilie. On observe généralement une forte fixation des composés aux matériaux dérivés de silicone (ex : PDMS (polydiméthylsiloxane)),
- Pouvoir garantir une bonne reproductibilité dans l'ensemencement des cellules,
- Permettre de maintenir les cellules en bonne compétence métabolique avec des activités cellulaires proches des niveaux *in vivo*.

Plusieurs systèmes *in vitro*, plus physiologiquement pertinents et associant la culture 3D d'hépatocytes humains aux conditions dynamiques, ont été évalués pour leur capacité à :

- Mieux prédire la clairance métabolique chez l'homme en particulier pour l'étude des molécules à faible clairance,
- Prédire les interactions médicamenteuses liées à de l'induction ou de l'inhibition temps-dépendante des cytochromes P450 (CYP),
- Prédire la toxicité hépatique liée à des administrations chroniques ou répétées de molécules,
- Etudier les aspects mécanistiques des toxicités observées.

Les résultats obtenus ont démontré :

- Une augmentation de la longévité du tissu fonctionnel viable
- Une différenciation hépatique conservée et des fonctions spécifiques du foie maintenues chez les hépatocytes humains cultivés dans ces conditions avec des caractéristiques morphologiques de cellules bien différenciées (canalicules biliaires, jonctions serrées,). Un meilleur maintien des fonctions cellulaires de base comme le stockage de glycogène ou la sécrétion d'albumine,
- Une expression des gènes des principales enzymes de phase I et II ainsi que des transporteurs et des récepteurs nucléaires stables durant la culture,
- Une capacité métabolique ainsi que l'inductibilité des CYP stables durant au moins une semaine,
- La capacité à étudier sur une durée prolongée le métabolisme de molécules de référence avec la détection des métabolites des principales isoformes de CYP à des niveaux supérieurs à ceux observés dans des conditions statiques.

Malgré la supériorité des systèmes MPS, l'utilisation de certains modèles n'a pu être appliquée à l'étude des composés à faible clairance du fait du matériau utilisé pour leur fabrication (PDMS), et pour lesquels une forte adsorption des composés au plastique a été observée. L'utilisation de matériaux alternatifs notamment celui utilisé pour la fabrication des plaques de culture cellulaire (dérivé de polystyrène) a permis de surmonter ce problème.

La question d'un système avec ou sans pompe a également été évoquée. Les systèmes gravimétriques sont plus simples d'utilisation et nécessitent moins d'entretien.

Discussion

Les progrès remarquables dans le domaine des multi-organes sur puce ces dernières années vont dans le sens d'une utilisation croissante dans l'industrie pharmaceutique et ce dans un avenir proche.

Il reste néanmoins des défis à relever mais une considération croissante par les autorités de Santé pour encourager l'utilisation de données, même exploratoires, issues de ce type de systèmes serait utile. Pour exemple, la FDA met en place une initiative pour accepter, dans les dossiers, en complément des données consensuelles, des données issues de méthodes non-animales, même si celles-ci ne sont pas complètement validées.

Il faut donc valoriser ces modèles et dans le même temps reconnaître leurs limites actuelles dont certaines sont listées ci-dessous :

- Les analyses comparatives aux données cliniques humaines sont limitées,
- L'utilisation de systèmes MPS/3D devrait aider à décrypter les mécanismes d'action de la toxicité, par exemple, mais un développement et une validation sont nécessaires pour les technologies complexes. En effet, aujourd'hui, peu de modèles sont « prêts à l'emploi » et

demandent une validation interne approfondie en termes de caractérisation, reproductibilité, débit, « readout »/paramètres évalués, ...

- Chaque étape du processus de modélisation 3D doit être optimisée et standardisée afin de limiter la variabilité inter-puces ou inter-plaques par exemple.
- La question de la performance des méthodes non animales (validité, standardisation interlaboratoire) doit être clairement abordée pour augmenter l'acceptation globale.

Les modèles MPS offrent de belles perspectives mais il est nécessaire de définir leur utilisation dans un contexte pertinent et les considérer en combinaison avec d'autres modèles *in vitro* (2D par exemple) et *in silico* peut s'avérer nécessaire. Ils présentent pour l'instant plus de valeur dans les phases « précoces » et de recherche des mécanismes d'action.

Le constat est que ces technologies sont en constante et surtout rapide évolution et qu'un partage des avancées est nécessaire. En effet, bien que ces systèmes soient utiles et très prometteurs, il est encore nécessaire d'améliorer leur reproductibilité et leur robustesse afin de pouvoir les utiliser dans un processus de décision et d'acceptation réglementaire.

1.2. Organes sur puce : Analyse critique des données issues de la littérature

Lors de la précédente réunion du 12 mars, les experts ont souligné qu'il est opportun de compiler à partir des données issues de la littérature les différentes définitions existantes de ce qu'est un « organe sur puce ». Ce travail a été effectué par Athina Morcos, stagiaire à l'ANSM depuis avril 2021. Comme ce travail est à ses débuts, Athina a pu identifier 9 articles parmi 11 qui présentent une définition des organes sur puces. Tous les articles analysés mettent en évidence des modèles assortis d'un système microfluidique.

EUROoCS, la société européenne des organes sur puce, définit un organe-sur-puce comme un dispositif à base microfluidique, contenant des sous-structures d'organes conçus dans un micro ou nanoenvironnement contrôlé, qui récapitulent un ou plusieurs aspects de la dynamique, de la fonctionnalité et de la réponse physiopathologique d'un organe *in vivo*, en surveillance en temps réel (cette définition a été établie par le groupe européen ORCHID le 23 mai 2018). Les organes sur puces peuvent être distingués en 2 types distincts : les systèmes à un seul organe et les systèmes à plusieurs organes. Selon la FDA, les organes sur puces sont une sous classe des systèmes microphysiologiques (« microphysiological system ou MPS »). Ces systèmes sont caractérisés par un environnement physiologique miniaturisé conçu pour produire et/ou analyser des unités de tissus fonctionnels capables de modéliser des réponses spécifiques/ciblées au niveau des organes.

La définition que nous proposons provisoirement à partir de la collecte des définitions issues de la littérature est la suivante : « un système microphysiologique combinant l'ingénierie tissulaire et la technique microfluidique, composé d'un ou de plusieurs types cellulaires *in vitro*, en 3D perfusé(s) en continu. Ce modèle consiste à reproduire l'architecture proche de la physiologie *in vivo*, en recréant un microenvironnement propre à l'organe grâce à différents stimuli (mécanique, électrique ou biochimique). »

En ce qui concerne les aspects techniques, il ressort des investigations que l'hydrogel le plus couramment utilisé est le PDMS (polydiméthylsiloxane) car il est biocompatible, flexible, transparent et possède des bonnes propriétés mécaniques. Sur les 11 articles étudiés, 55% des modèles utilisaient le PDMS. Cependant, l'utilisation de ce matériau a des limites puisqu'il adsorbe les petites molécules hydrophobes et les libère par la suite ce qui pose un problème d'interprétation et de pertinence des résultats dans les études de toxicologie. Il existe donc des alternatives au PDMS tel que le Flexdym™ Polymer de Cherry Biotech également flexible, biocompatible et transparent.

Le focus du groupe de travail porte principalement sur un organe essentiel qu'est le foie. Il existe des modèles utilisant un système avec pompe et d'autres sans pompe. Sur 18 modèles étudiés, 44% sont des cultures monocellulaires et 39% des co-cultures. Dans environ 27,8% des études, des hépatocytes primaires humains (considérés comme le « gold standard » pour les études d'hépatotoxicité) ont été utilisés contre 33,3% pour les cellules HepG2 ou HepaRG. Celles-ci peuvent être cultivées en co-culture avec des cellules endothéliales (33,3%) ou des cellules de Kupffer (16,8%).

Plusieurs modèles 3D ont été étudiés au regard des autres méthodes classiques (2D) à des fins de comparaison. Lee et al. (2019) ont comparé la sécrétion d'albumine et d'urée entre un foie-sur-puce perfusé et composé de cellules HepaRG et HUVEC créé par impression 3D à des monocultures d'hépatocytes en 2D et à des hépatocytes encapsulés en 3D. La sécrétion d'albumine et d'urée est significativement augmentée et reste constante pendant les 7 jours dans le foie-sur-puce par rapport aux autres modèles classiques. Ensuite, le même modèle de foie-sur-puce a été comparé selon 2 systèmes différents, l'un avec un flux biliaire et l'autre sans. La sécrétion d'albumine, d'urée et le niveau d'expression des CYP sont significativement supérieurs dans le modèle construit avec un courant de bile par rapport à celui qui en est dépourvu.

Dans une autre étude, Jang et al. (2019) ont comparé des modèles de foie-sur-puce à partir de cellules d'humain, de rat ou de chien, composés d'une co-culture d'hépatocytes et de cellules endothéliales. La sécrétion d'albumine dans le foie-sur-puce d'humain est équivalente à celle retrouvée *in vivo* chez l'homme (entre 20 à 70 µg/jour/million de cellules vs 50 µg/jour/million de cellules *in vivo*). Ensuite, du bosentan a été administré à des foies-sur-puces et comparé à des monocultures d'hépatocytes : la concentration à laquelle on observe une toxicité sur le foie-sur-puce d'humain corrèle avec celle *in vivo*. Le bosentan (inhibiteur des récepteurs à l'endothéline) entraîne une cholestase chez l'humain mais cet effet toxique n'est pas observé chez le rat ni le chien. Celui-ci entraîne des lésions hépatiques dues à une accumulation des sels biliaires dans les cellules hépatiques humaines. Cette accumulation de sels biliaires est retrouvée sur les foies sur puces d'homme et corrèlent effectivement avec la réponse clinique. La concentration à laquelle une toxicité a été détectée dans la puce corrèle avec la concentration plasmatique induisant des lésions hépatiques chez l'homme ($C_{max} = 7,4 \mu M$). Une autre molécule, la fialuridine (potentiellement efficace dans le traitement de l'hépatite B) a fait l'objet d'une interruption de son développement clinique en phase 2 en 1993 suite à la mort de 5 patients (sur 15) par induction d'une stéatose hépatique. Cependant, les données toxicologiques non cliniques n'avaient pas permis de prédire une telle toxicité chez l'homme. L'administration journalière de 1, 10 ou 30 µM pendant 10 jours dans les foies-sur-puce a montré une accumulation lipidique dose-dépendante chez l'homme et non chez le rat ce qui corrèle effectivement avec les données observées *in vivo* chez l'homme et les données non cliniques retrouvées.

La question de la standardisation et la validation des organes sur puces a été abordée, étape essentielle pour leur approbation réglementaire. La société européenne des organes-sur-puces EUROoCS a créé une feuille de route pour guider les efforts de recherche entrepris suite au projet ORCHID. C'est dans ce but qu'un séminaire « Putting Science into Standards » a eu lieu en avril 2021 sur le thème des organes sur puces par le Joint Research Center (JRC) de la Commission européenne et le Comité européen de normalisation en électronique et en électrotechnique (CEN-CENELEC). Dans le cadre de ces évolutions réglementaires, il est important de mettre l'accent sur un article paru le 3 mai 2021 de Si et al. (2021) du Wyss Institute, faisant état d'un modèle de voies respiratoires sur puce mis au point pour étudier l'effet de 8 médicaments ayant démontré une activité *in vitro* dans des cultures statiques contre une infection au SARS-CoV-2. Seulement 3 molécules, l'amodiaquine, le toremifène et le clomiphène ont empêché de manière significative l'entrée virale sans affecter la viabilité cellulaire sur les puces. L'amodiaquine, la plus puissante, a réduit l'infection de 60% sur les puces et possède une activité significative *in vitro* et *in vivo* (chez le hamster). Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase 2 contre la COVID-19.

Conclusions du CSP

Le groupe de travail a apprécié la présentation de Sanofi qui était d'une grande qualité. L'approche utilisée dans cet échange était très pragmatique et transparente.

Il s'agit de poursuivre les travaux qui ont été initiés en poursuivant les auditions de parties prenantes, en particulier celles proposant des solutions techniques aux laboratoires utilisateurs de ces nouveaux outils d'évaluation.

Question posée : Elaborer une doctrine d'évaluation des technologies d'organes sur puces dans le processus de développement d'un candidat médicament ?

Votes

Nombre de votants	5/5
Nombre d'avis favorables	5/5
Nombre d'avis défavorables	0/5
Nombre d'abstention	0/5
Explication des votes	
Avis majoritaires	Oui
Avis minoritaires	Non

Conclusions

L'avis général s'inscrit dans le cadre d'une continuité des travaux et d'évolution dans la réflexion autour de la technologie d'organes sur puce considérée d'essor grandissant dans l'alternative à l'expérimentation animale. Le retour d'expérience des parties prenantes est un axe à privilégier pour mieux circonscrire la thématique.

Références documentaires

- Jang, K.-J. et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Science Translational Medicine* 11, (2019).
- Lee, H. et al. Cell-printed 3D liver-on-a-chip possessing a liver microenvironment and biliary system. *Biofabrication* 11, 025001 (2019).
- Si, L. et al. A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics. *Nature Biomedical Engineering* 1–15 (2021) doi:10.1038/s41551-021-00718-9.

Sites internet :

- <https://euroocs.eu/organ-on-chip/>
- Cherry Biotech. Alternative to PDMS: a new biocompatible polymer for microfluidics -. <https://innovation.cherrybiotech.com/microphysiological-systems/pdms-microfluidics-biocompatible-polymer> (2017).
- « Advancing Alternative Methods at FDA », FDA, janv. 2021, <https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancingalternative-methods-fda>.

