



Mise en place d'études cliniques portant sur des antioxydants

Patrice CHIAP, Pharm., PhD

Advanced Technology Corporation (A.T.C. Pharma), CHU de Liège
Institut de Pharmacie, B36, 4000 Liège, Belgique

Adebiotech - StressOX

1 juin 2016 - Biocitech, Romainville, France

Plan de l'exposé

1. Cadre législatif propre aux essais cliniques
2. Méthodologie des essais cliniques
3. Exemples d'étude clinique sur antioxydants

Cadre législatif propre aux essais cliniques

Législation internationale

- **Déclaration d'Helsinki** de l'Association Médicale Mondiale (AMM) de juin 1964 (et ses amendements) - **Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains**
- **Directive 2001/20/CE** du Parlement Européen et du Conseil du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de **bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain**
- **Règlement (UE) n°536/2014** relatif aux **essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE**. Ce règlement a été adopté par le Conseil de l'UE le 16 avril 2014. Il a été publié au journal officiel de l'Union Européenne le 27 mai 2014 et son entrée en vigueur est prévue dans le courant 2016

Directive 2001/20/CE du Parlement Européen et du Conseil du 4 avril 2001

- Cette Directive fixe des dispositions spécifiques concernant la conduite des **essais cliniques** effectués sur des **êtres humains** et portant sur les **médicaments**, en particulier en ce qui concerne l'application de bonnes pratiques cliniques
- Les **Bonnes Pratiques Cliniques** constituent un ensemble **d'exigences de qualité** dans les domaines éthique et scientifique, qui doivent être respectées lors de la planification, la mise en œuvre, l'enregistrement et la notification des essais cliniques auxquels des êtres humains participent. Le respect de ces bonnes pratiques garantit la **protection des droits, de la sécurité et du bien-être** des participants à des essais cliniques, ainsi que la crédibilité des résultats des essais cliniques

Législations nationales

- France :
 - ✓ **Loi de Santé publique 2004 - Loi n° 2004-806 du 9 août 2004** relative à la politique de santé publique fixant les conditions des recherches biomédicales pratiquées et organisées en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales
 - ✓ **Loi n°2012-300 du 5 mars 2012 : Loi « Jardé »** (recherche impliquant la personne humaine et plus de recherche biomédicale; cadre unique plus harmonisé à toutes les recherches impliquant la personne humaine)
 - ✓ **Code de la Santé Publique (CSP)** - Titre II : Recherches biomédicales
- Belgique :
 - ✓ **Loi du 7 mai 2004** relative aux expérimentations sur la personne humaine

Etudes cliniques portant sur des compléments alimentaires

- Pas de demande d'autorisation préalable auprès des autorités : AFMPS (Belgique); ANSM (France)
- Pas de demande de numéro EudraCT comme identification de l'essai clinique
- MAIS, avis obligatoire du **Comité d'Ethique** (Belgique) ou du **Comité de Protection des Personnes** (France) indépendant (du promoteur)

Comité d'éthique (B)

Comité de Protection des Personnes (F)

- Une étude clinique ne peut commencer qu'après un **avis FAVORABLE** d'un Comité d'éthique ou d'un Comité de Protection des Personnes en tenant compte des éléments suivants :
 - ✓ La **pertinence de l'expérimentation** et de sa conception
 - ✓ La **balance bénéfice / risque**
 - ✓ Le **protocole clinique**
 - ✓ Le **cahier d'observation (CRF)**
 - ✓ La **compétence de l'investigateur** et de ses collaborateurs
 - ✓ La **notice d'information** destinée aux participants
 - ✓ La **brochure** destinée à l'investigateur
 - ✓ La **qualité des installations**

Comité d'éthique (B)

Comité de Protection des Personnes (F)

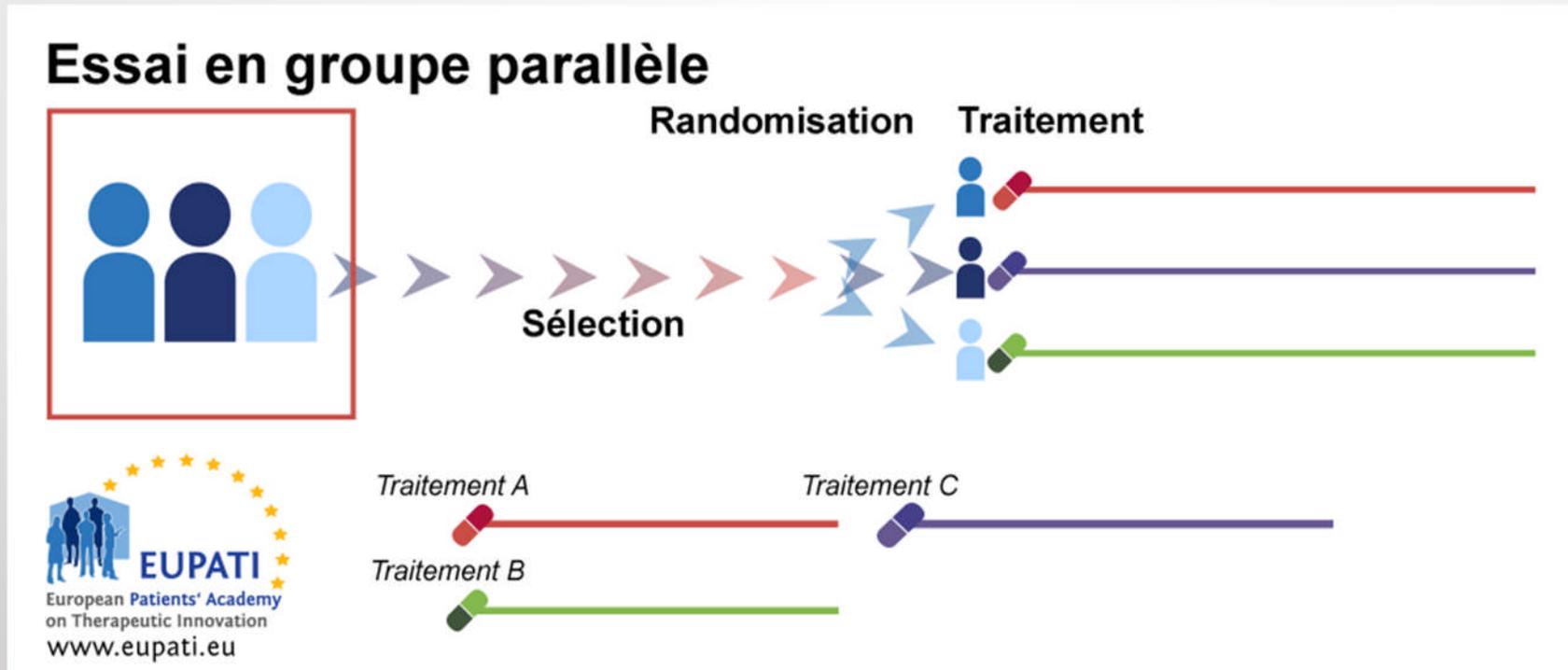
- Une étude clinique ne peut commencer qu'après un **avis FAVORABLE** d'un Comité d'éthique ou d'un Comité de Protection des Personnes en tenant compte des éléments suivants :
 - ✓ L'adéquation et l'exhaustivité des informations écrites à fournir ainsi que la procédure à suivre pour obtenir le **consentement éclairé** des sujets participant à l'étude
 - ✓ Les modalités de recrutement des sujets (**critères d'inclusion et d'exclusion**)
 - ✓ Les dispositions prévues en vue de la **réparation et/ou de l'indemnisation en cas de dommages ou de décès** du participant imputables à l'expérimentation
 - ✓ Les **assurances** et autres **garanties** couvrant la responsabilité de l'investigateur et du promoteur
 - ✓ Les modalités de **rétribution/d'indemnisation des participants**
 - ✓ Les éléments pertinents du **contrat entre le promoteur et le site d'investigation**

Méthodologie des essais cliniques

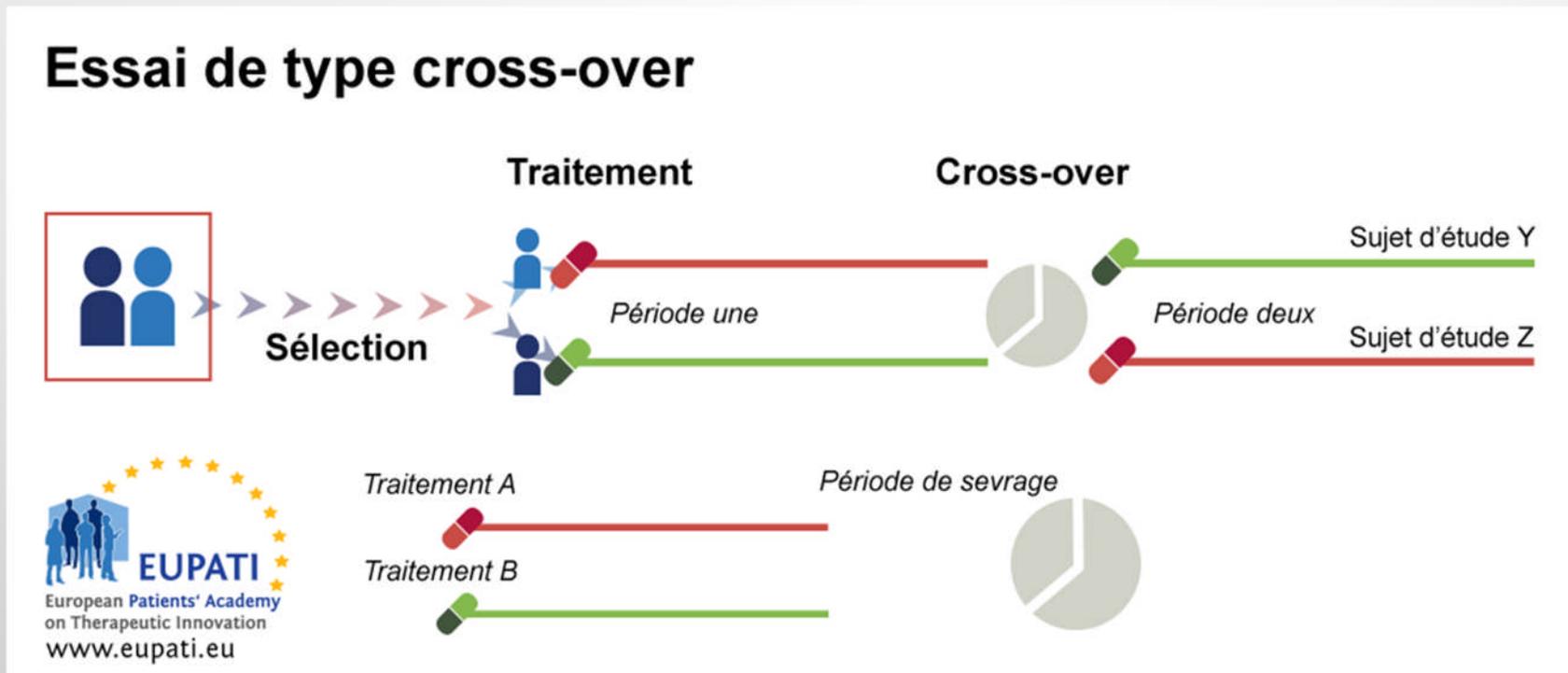
Types de méthodologie

- Essai **contrôlé non-randomisé**
- Essai **contrôlé randomisé** :
 - ✓ En groupe parallèle
 - ✓ De type croisé (« cross-over »)
 - ✓ D'arrêt
 - ✓ Basé sur des paires appariées
- En **simple ou en double insu** (simple ou double aveugle)
- Essai de **supériorité**, d'**équivalence** ou de **non-infériorité**

Méthodologie en groupe parallèle



Méthodologie de type cross-over (2 x 2)

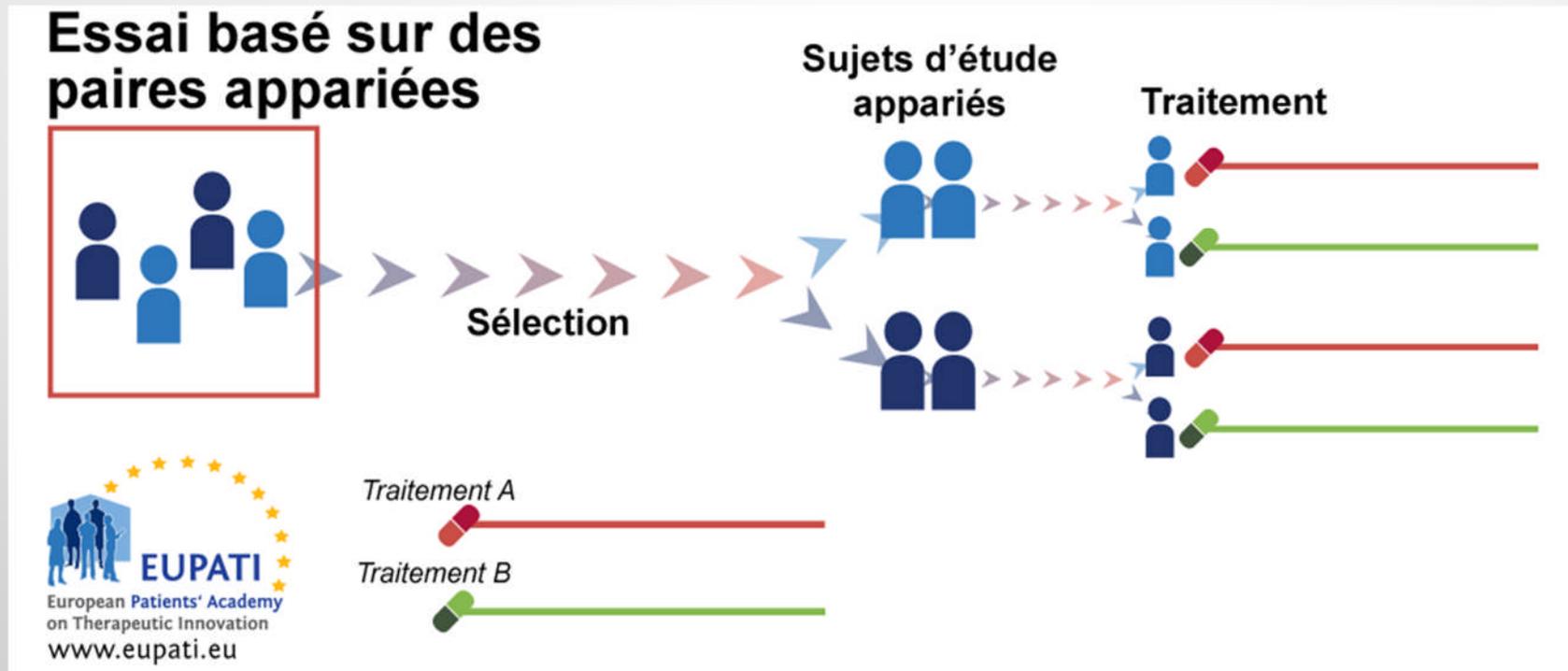


Méthodologie d'arrêt

Essai d'arrêt



Méthodologie basée sur des paires appariées



Méthodologies des essais cliniques comparatifs

- **Les essais comparatifs de supériorité** démontrent que le produit expérimental est meilleur que le contrôle
- **Les essais comparatifs d'équivalence** démontrent que la mesure du critère d'évaluation est similaire (ni pire, ni meilleure) que le contrôle
- **Les essais comparatifs de non-infériorité** démontrent que le produit expérimental n'est pas pire que le contrôle
- **Les essais sur la relation dose-réponse** définissent les divers paramètres posologiques, dont la dose de départ et la dose maximale

Exemples d'étude clinique

Etude de la biodisponibilité chez l'Homme d'une forme orale de Curcumine

| | PRÉ-RANDOMISATION | POST-RANDOMISATION | POST-RANDOMISATION |
|---|-------------------------------------|--|--|
| | SCREENING | ETUDE CLINIQUE (PARTIE I) | ETUDE CLINIQUE (PARTIE II) |
| JOURS | J -15 à J -1 | J1 | J1+14 |
| Consentement éclairé | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Données démographiques | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Critères Inclusion/Exclusion | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Dossier médical, poids, taille | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Examen clinique | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Signes vitaux | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Traitement concomitant | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Traitement | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Traitement attribué | | Groupe A : 2 gélules Groupe B : 4 gélules | Groupe A : 4 gélules Groupe B : 2 gélules |
| Prélèvement sanguin pour pharmacocinétique | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Prélèvement des urines pour pharmacocinétique | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Effets indésirables | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Décharge médicale | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |

Liste de critères d'inclusion

- Age : de 18 à 55 ans
- Sexe : 6 hommes et 6 femmes
- Indice de masse corporelle : 18.0 – 28.0 kg/m²
- Santé : les volontaires sont sains. Leur état de santé sera établi par le médecin responsable sur base de leur dossier médical, d'une anamnèse et d'un examen médical
- Non-fumeurs ou fumant moins de 5 cigarettes par jour
- Le sujet doit avoir donné son consentement libre et éclairé et signé le consentement
- Le sujet doit être affilié à un régime de sécurité sociale
- Le sujet doit être libre pour toute la durée de l'étude

Liste de critères d'exclusion

- Age : volontaires sains âgés de moins de 18 ans et plus de 55 ans
- Sexe : femmes en cours de grossesse ou femmes allaitantes. L'absence de grossesse sera vérifiée lors du recrutement et revérifié le matin avant d'administrer le produit à tester
- Indice de masse corporelle : inférieur à 18,0 et supérieur à 28,0 kg/m²
- Santé : exclusion des volontaires sains déjà traités pour des troubles gastro-intestinaux comme des ulcères, ainsi que pour des convulsions, des dépressions ou des troubles hépatiques. Exclusion des volontaires sains avec un historique de problèmes psychiatriques, respiratoires, ou cardiovasculaires
- Traitement : les volontaires sains ne doivent être sous aucun traitement médicamenteux depuis 15 jours avant le screening jusqu'au jour suivant la fin de l'étude

Liste de critères d'exclusion

- Sujets toxicomanes ou ayant consommé de l'alcool en quantité excessive dans les 6 derniers mois, soit une consommation quotidienne de plus de 3 verres de boisson alcoolisée par jour
- Consommation exagérée de xanthines (consommation quotidienne de plus de 5 tasses de thé, café, cacao, cola,....ou plus de 2 barres de chocolat)
- Fumeur de plus de 5 cigarettes pas jour
- Sujets incapables de se conformer aux exigences de l'étude
- Sujets ayant donné leur sang dans le mois précédent le début de l'étude
- Sujets n'ayant pas signé le formulaire de consentement éclairé

Normalisation pour repas et boissons



- Les sujets doivent éviter toute consommation de plats contenant de la curcumine 14 jours avant le début du test et durant les 14 jours séparant les deux phases d'essai (pas de consommation de curry, cuisine indienne, curcuma...). Les sujets compléteront un questionnaire sur leur alimentation afin de vérifier l'absence de curcumine dans leur régime alimentaire récent
- Les sujets doivent s'abstenir de toute boisson alcoolisée depuis au moins 48 heures avant l'étude
- Les sujets doivent être à jeun depuis la veille à 22h.
- Le matin de l'étude, les sujets peuvent consommer 200 ml d'eau deux heures avant l'administration du complément alimentaire; la dose de complément alimentaire est prise avec un volume standard d'eau (150 ml), à température ambiante
- Quatre heures après l'administration du complément alimentaire, ils peuvent prendre un repas normal exempt d'aliments riches en curcumine
- Le contenu et l'heure des repas seront annexés au Cahier d'observation

Etude clinique



ETUDE CLINIQUE – JOUR 1

Date d'arrivée au centre clinique

|_|_| / |_|_| / |2|0|_|_|

| TEST DE GROSSESSE | | PRÉ-DOSE | |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Résultat | Négatif | Positif | Si sujet masculin, |
| Test de grossesse urinaire HCG | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Si le sujet féminin a un test de grossesse positif, elle doit être exclue de l'étude.

| SIGNES VITAUX | | PRÉ-DOSE | |
|--|---------------------------|-------------|-------------|
| Position | Tension artérielle (mmHg) | | Pouls (bpm) |
| | Systolique | Diastolique | |
| 5 minutes assis | _ _ _ | _ _ _ | _ _ _ |
| Recheck <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non | _ _ _ | _ _ _ | _ _ _ |

ADMINISTRATION DU TRAITEMENT

Conditions de l'administration du traitement

- administration de 2 gélules avec 150 ml d'eau plate à température ambiante
- administration de 4 gélules avec 150 ml d'eau plate à température ambiante

| | Heure théorique de l'administration | Heure réelle | Si non, encoder l'heure exacte |
|----|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| T0 | 8h03 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min |

| | Heure théorique des Prélèvements | Si pas de déviation, Cochez la case | Si non, encoder l'heure exacte |
|-------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Pré-dose | 07h33 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |
| T 1h | 09h03 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |
| T 2h | 10h03 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |
| T 4h | 12h03 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |
| T 8h | 16h03 | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |
| T 24h (J+1) | 8h03 (J+1) | Effectué <input type="checkbox"/> | _ _ h _ _ min. |

Résultats des dosages plasmatiques



Méthode UHPLC-MS/MS validée

| | Concentration de Curcumine (ng/mL) chez les sujets 7 à 12 (partie I) | | | | | |
|----------|--|------|------|------|------|------|
| | 007 | 008 | 009 | 010 | 011 | 012 |
| Pre-dose | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 1h | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 2h | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 4h | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 8h | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 24h | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |

LOD : Limit of Detection (1,5 ng/mL)



Résultats des dosages plasmatiques après hydrolyse enzymatique



Méthode UHPLC-MS/MS validée

| | Concentration de Curcumine (ng/mL) chez les sujets 7 à 12 (partie I) | | | | | |
|---------|--|----------|------|----------|------|------|
| | 007 | 008 | 009 | 010 | 011 | 012 |
| Predose | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| 1h | 85.4 | 82.0 | 212 | 681 | 447 | 538 |
| 2h | 28.9 | 21.9 | 73.4 | 227 | 196 | 229 |
| 4h | 15.3 | 7.70 | 26.6 | 112 | 78.7 | 121 |
| 8h | 12.2 | 21.1 | 9.10 | 56.1 | 80.8 | 30.7 |
| 24h | BLQ(1.7) | BLQ(2.1) | <LOD | BLQ(1.5) | 8.0 | 5.0 |

BLQ : Below the Limit of Quantification (5 ng/mL)

LOD : Limit of Detection (1,5 ng/mL)



Importance de l'ajout de l'enzyme « β -glucuronidase arylsulfatase » dans les échantillons plasmatiques pour **l'hydrolyse des métabolites conjugués** de la Curcumine avant analyse



Autre étude clinique sur la Curcumine



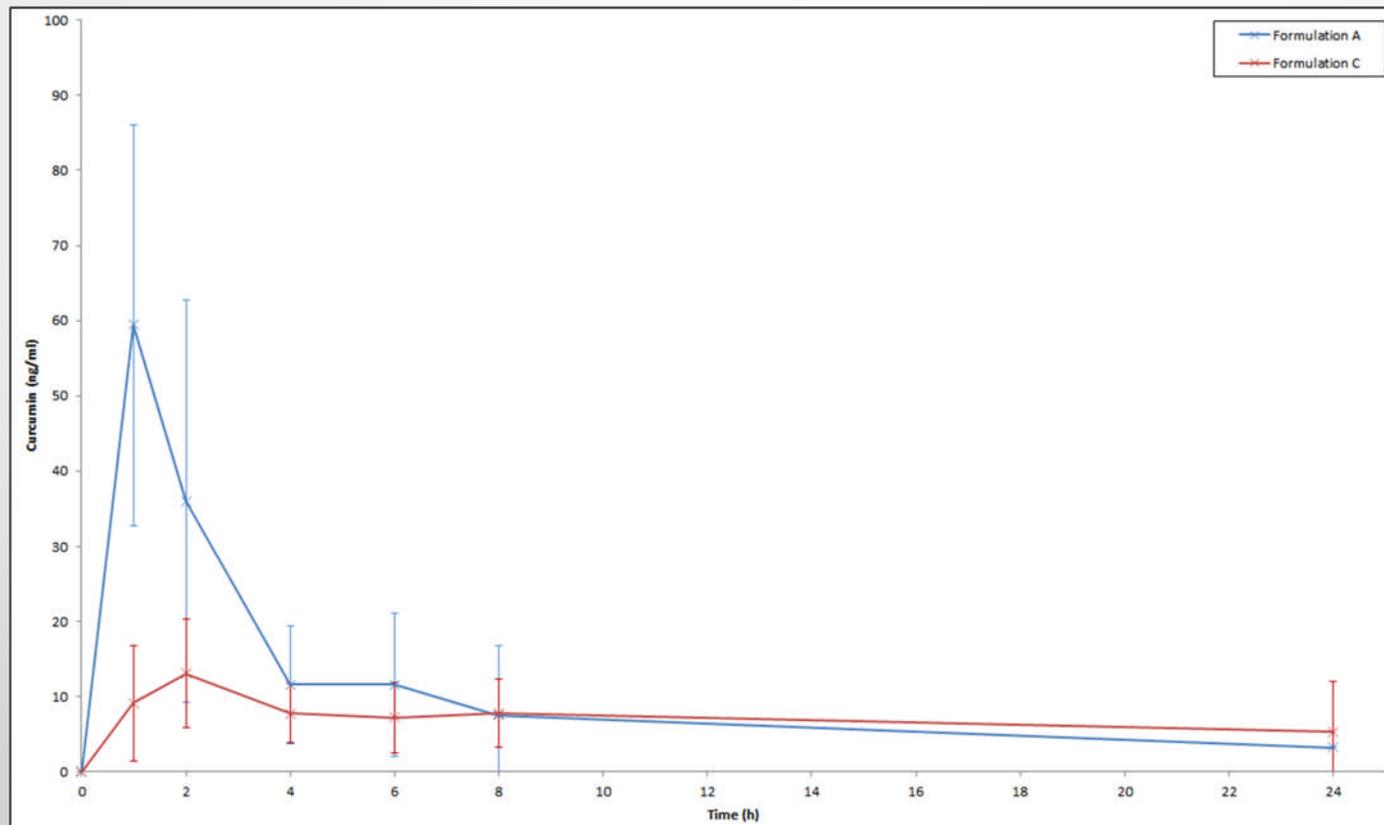
Résultats de l'analyse pharmacocinétique

| | Formulation A | Formulation C | Units |
|---------------------------|---------------|---------------|------------------|
| Dose | 52.5 | 462.5 | {mg} |
| R ² | 0.958 | 0.933 | |
| R _{nbpoint} | 4 | 4 | |
| R _{start} | 4 | 4 | {h} |
| R _{end} | 24 | 24 | {h} |
| T _{last} | 24 | 24 | {h} |
| T _{max} | 1 | 2 | {h} |
| C _{max} | 59.4 | 13.1 | {ng/mL} |
| C _{max} /Dose | 1.132 | 0.0283 | {ng/mL}/{mg} |
| AUC _{last} | 253.1 | 170.1 | {h}*{ng/mL} |
| AUC _{last} /Dose | 4.821 | 0.368 | {h}*{ng/mL}/{mg} |
| AUMC _{last} | 1555.0 | 1760.6 | {h}*{h}*{ng/mL} |
| Lz | 0.0649 | 0.0195 | 1/{h} |
| T _{half} | 10.7 | 35.6 | {h} |
| Vz | 2.68 | 54.00 | {mg}/{ng/mL} |
| Clearance | 0.174 | 1.053 | {mg}/{h}*{ng/mL} |
| MRT _{last} | 6.1 | 10.4 | {h} |

Autre étude clinique sur la Curcumine



Comparaison de courbes de pharmacocinétique

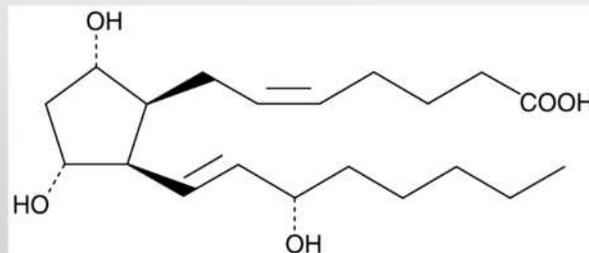


Dosage de biomarqueurs

Peroxydation lipidique - Stress Oxydant

Développement d'une méthode UHPLC-MS/MS originale

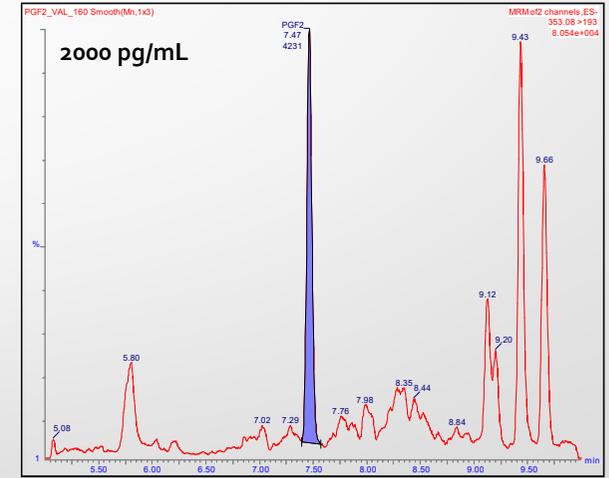
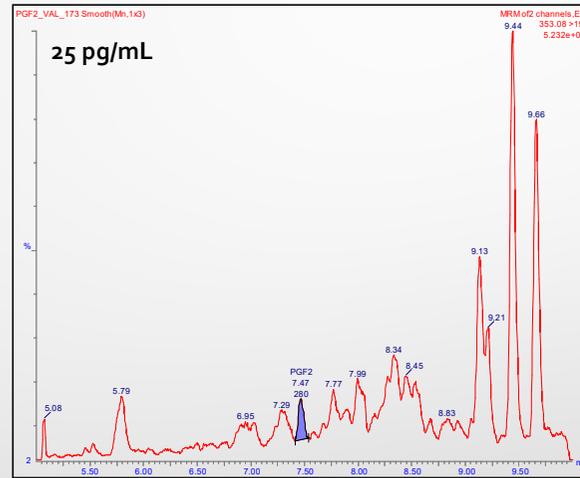
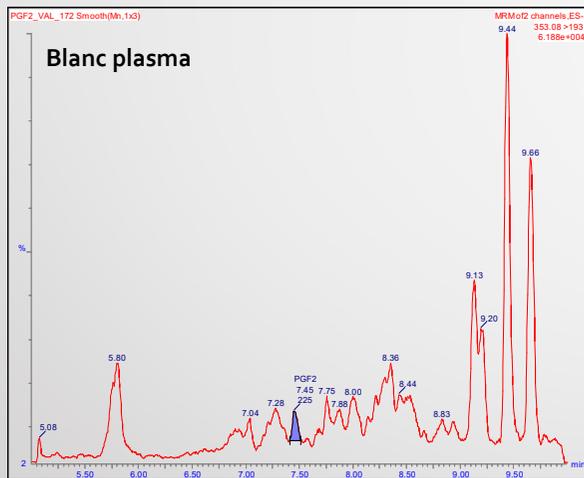
Dosage en milieu biologique (plasma, urine) du **15-F_{2t}-isoprostane** (8-isoprostane) : biomarqueur gold standard de la peroxydation lipidique impliquée dans le stress oxydant



Dosage du 15-F2t-isoprostane



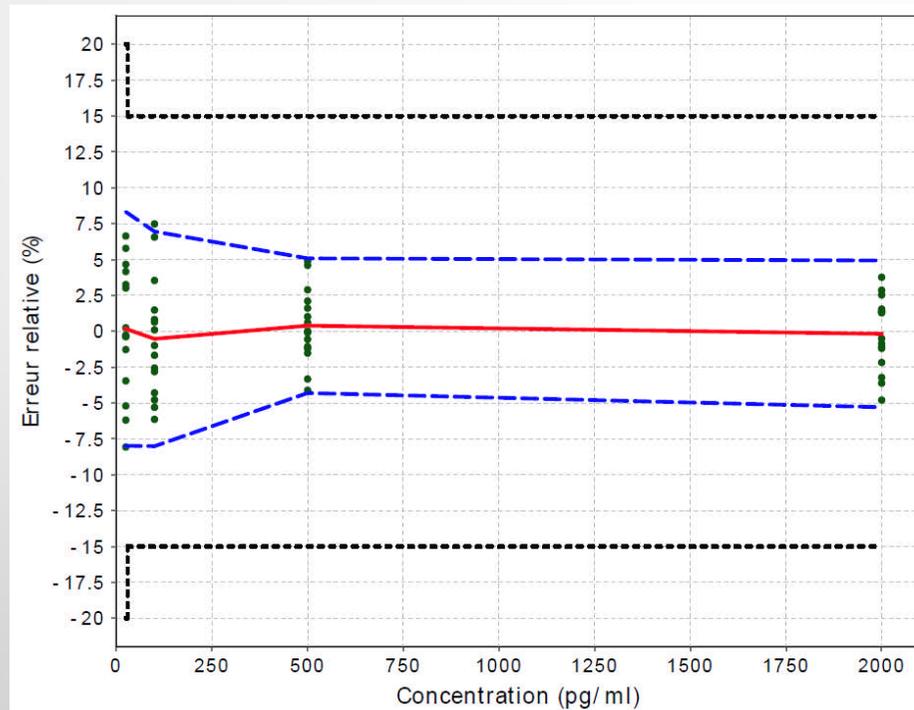
Méthode bioanalytique validée de 25 pg/mL à 2000 pg/mL



Dosage du 15-F2t-isoprostane

Méthode bioanalytique validée de 25 pg/mL à 2000 pg/mL

Profil d'exactitude



Limite d'acceptation

Biais relatif moyen

Intervalle de tolérance

Remerciements



- ❖ Dr. Joël PINCEMAIL, Service de Chirurgie Cardiovasculaire du CHU de Liège (Pr. J.-O. DEFRAIGNE)
- ❖ Jean-Claude VAN HEUGEN, Thomas DUBROWSKI et Enza ARANCIO de l'Unité Bioanalytique d'A.T.C.
- ❖ L'Unité de Pharmacologie Clinique d'A.T.C. (Pr. A. SCHEEN)
- ❖ Pr. Thierry DURAND, Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM) – UMR 5247-CNRS-UM-ENSCM, Faculté de Pharmacie, Montpellier





La garantie universitaire du savoir-faire liégeois en matière de stress oxydant

*Service de Chirurgie Cardiovasculaire du CHU de Liège et Laboratoire
de référence universitaire UNILAB Liège pour l'évaluation in vivo du stress oxydant*

Unité de Biotechnologie des Plantes de l'Université de Liège et Cedevit

Service de Nutrition et de Diabétologie du CHU de Liège

Service des Tissus conjonctifs de l'Université de Liège

*Service « Nutrition, environnement et santé » du Département des Sciences de la
Santé publique, Université de Liège*

Service de Gériatrie du CHU de Liège

Département des Sciences Biomédicales et Précliniques de l'Université de Liège

Advanced Technology Corporation (A.T.C. Pharma), CRO du CHU de Liège

Merci pour votre attention

Advanced
Technology
Corporation



A.T.C. s.a.

Institut de Pharmacie B36 – Avenue Hippocrate 15, CHU Sart-Tilman – 4000 Liège – Belgique

T. : +32 (0)4 366 43 50 – patrice.chiap@atc-pharma.be

www.atc-pharma.be