

Rapport du Comité Scientifique Spécialisé Temporaire (CSST) « Inhibiteurs de la FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*) » sur les causes de l'accident survenu à Rennes lors d'un essai clinique de Phase 1 en janvier 2016.

1. Avant propos

Le CSST « inhibiteurs de la FAAH » a été mis en place par le Directeur Général de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire du Médicament et des produits de santé (ANSM), à la suite de l'accident survenu le 10 janvier 2016 à Rennes lors de l'essai clinique de Phase 1, première administration à l'homme, de la molécule BIA 10-2474.

Les missions du CSST, scientifiques, étaient, sur la base des données mises à leur disposition et de l'expertise de ses membres :

- D'analyser les mécanismes d'action et l'éventuelle toxicité des substances qui, comme le BIA 10-2474, sont censées agir, directement ou indirectement, *via* le système endocannabinoïde.
- De formuler et, si possible, hiérarchiser des hypothèses permettant d'expliquer la toxicité observée chez plusieurs volontaires de l'essai mené à Rennes par Biotrial.
- D'édicter, le cas échéant, des recommandations générales visant à renforcer la sécurité des volontaires, notamment lors des études de première administration à l'homme (Phase 1).

La mission du CSST s'est, depuis sa mise en place (25 janvier 2016) jusqu'au rendu de son rapport (18 avril 2016), organisée selon trois modes :

- Un travail d'expertise individuelle, menée par chacun de ses membres, sur les différents documents mis à leur disposition et la littérature afférente.
- Deux réunions « ouvertes » d'une journée (15 février et 24 mars 2016) au cours desquelles ces expertises étaient rapportées. Une rencontre avec le Laboratoire Bial a également eu lieu le 18 mars 2016. Ces trois réunions se sont tenues dans les locaux de l'ANSM, en présence de deux inspecteurs de l'Inspection Générale des Affaires Sociales, IGAS (Christine d'Autume et Gilles Duhamel). Par ailleurs, un représentant de l'EMA (Agence Européenne du Médicament) assistait, en tant qu'observateur, aux réunions du 15 février (Hans-Georg Eichler) et du 24 mars (Jean Marc Vidal) ; deux représentantes de l'Agence Portugaise du Médicament (Ana Catarina Fonseca et Isabel Vieira) ont également participé, en tant qu'observatrices, à cette dernière réunion.
- Une phase d'échanges et de rédaction collective restreinte aux seuls membres du CSST, ayant abouti à l'approbation des deux versions (intermédiaire et finale) du présent rapport.

Cette organisation a permis de réserver la discussion des points clefs de l'expertise, de ses conclusions et des recommandations qui en découlent aux seuls membres du CSST, indépendamment de l'organisateur (ANSM) et des observateurs (inspecteurs généraux

de l'IGAS, représentants des agences européenne et portugaise). Cette phase restreinte a, de loin, représenté la plus grande partie du travail du CSST.

La mission des experts du CSST, bien qu'elle ait représenté une somme de travail importante (estimée à plus de 600 heures au total), n'avait nullement vocation à se substituer à une inspection. A ce titre, les conclusions du présent rapport ne sauraient préjuger de celles des enquêtes administratives et judiciaires actuellement en cours.

Concernant les documents sources utilisés, notons en préambule que la Brochure Investigateur du BIA 10-2474, rédigée par le Laboratoire Bial, comporte des imperfections de traduction, erreurs de retranscription, notamment dans les tables et figures. Ceci est, en plusieurs endroits, de nature à générer des ambiguïtés et difficultés de compréhension, y compris vis-à-vis d'informations importantes (voir au chapitre 6). Ceci méritait d'être signalé car la Brochure Investigateur est un document référent pour l'évaluation d'un produit de santé ainsi que rappelé, entre autres, par l'Arrêté du 19 mai 2006 (*« relatif au contenu et aux modalités de présentation d'une brochure pour l'investigateur d'une recherche biomédicale portant sur un médicament à usage humain »*). Enfin, bien que le CSST ait été mis en place sur décision du Directeur Général de l'ANSM, et ait bénéficié du soutien logistique de cette Agence, le CSST a mené, durant les deux mois et demi de son existence, ses travaux et investigations en totale indépendance, notamment vis-à-vis de l'ANSM, du Laboratoire Bial, du centre Biotrial, des volontaires ayant participé à l'essai, de leurs familles et de leurs défenseurs.

L'ensemble des experts du CSST, ont travaillé de manière bénévole durant la totalité de leur mission.

La rédaction des diverses versions du présent rapport ont été soumises aux seuls experts du CSST et les nombreux échanges nécessaires à sa finalisation et à l'obtention d'un consensus sur les points-clefs du dossier ont toujours été restreints à cette configuration.

2. Composition du CSST

Bernard Bégaud (Pharmacologie Médicale. Université et CHU de Bordeaux. CR INSERM 1219), Marie Germaine Bousser (Hôpital Lariboisière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Université Paris-Diderot), Pascal Cohen (Médecine Interne, Hôpital Cochin, Paris), Bertrand Diquet (Pharmacologie Médicale et Toxicologie. Département Médecine UFR Santé. Université et CHU d'Angers), Pierre Duprat (Docteur Vétérinaire, Docteur en toxicologie, European College of Veterinary Pathologists) Walter Janssens (Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé, Belgique), Michel Mallaret (Pharmacologie Clinique, Centre Régional de Pharmacovigilance et d'Information sur le Médicament, CHU de Grenoble), Guy Mazué (Docteur Vétérinaire), Joëlle Micallef (Pharmacologie Médicale, Aix Marseille Université et CHU de Marseille, UMR CNRS 7289 Institut des Neurosciences Timone), Claude Monneret (Directeur de Recherche émérite au CNRS, Président de l'Académie de Pharmacie), Jean Louis Montastruc (Pharmacologie Médicale et Clinique. Faculté de Médecine et CHU de Toulouse), Laurent Venance (Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, Collège de France, INSERM U1050, CNRS UMR7241, Labex Memolife, Paris).

3. Contexte

La molécule BIA 10-2474 des Laboratoires Bial (Portela & Ca, Portugal) appartient à la famille des inhibiteurs de la FAAH, enzyme dégradant l'anandamide, biolipide agissant comme médiateur dans le système dit endocannabinoïde.

Plus d'une dizaine d'inhibiteurs de ce type sont, ou ont déjà été, développés, aucun n'ayant, à ce jour, été commercialisé ; pour beaucoup, en raison d'une efficacité jugée décevante. Ces inhibiteurs appartiennent, au plan chimie structurale, essentiellement à deux familles :

- Les molécules possédant une fonction *urée* : URB 524 et 597 et composés développés notamment par Sanofi-Aventis, Astellas, Bristol-Myers Squibb et Janssen & Janssen.
- Les molécules possédant une fonction *carbamate*, développées notamment par Sanofi-Aventis, Vernalis, Pfizer et Bial.

La recherche dans le domaine des inhibiteurs de la FAAH a été portée par des espoirs importants et des perspectives d'indications thérapeutiques très diverses : douleur, vomissements, anxiété, troubles de l'humeur, maladie de Parkinson, chorée de Huntington, diverses indications cardiovasculaires, pour n'en citer que quelques unes.

Pour le produit Bial, la Brochure Investigateur indique que le BIA 10-2474 a été développé « *en vue du traitement d'affections pour lesquelles il y aurait avantage à majorer les concentrations de cannabinoïdes endogènes* ».

L'indication semblant avoir été privilégiée, du moins dans un premier temps, est la douleur de type neuropathique ; ceci a été confirmé par le Laboratoire Bial lors de son audition, le 18 mars 2016.

Les études de première administration à l'homme ont été confiées à Biotrial Research à Rennes, centre spécialisé depuis près de vingt ans dans des investigations et recherches de ce type. L'accident survenu à la mi-janvier 2016 a conduit à la suspension du développement clinique du BIA 10-2474. Sa gravité et son caractère spectaculaire ont profondément marqué le milieu professionnel du médicament, les scientifiques et le public, tant en France que dans le Monde. Comprendre les circonstances et, si possible, les mécanismes de survenue de cet accident inédit est donc une priorité collective et la justification du travail d'expertise mené par le CSST.

Ce rapport d'expertise, après un rappel sur le système endocannabinoïde (prérequis nécessaire pour introduire la discussion sur les mécanismes d'action de la molécule et les hypothèses au sujet de sa toxicité) abordera l'analyse de la molécule, de ses propriétés pharmacologiques, puis celle des études de toxicité menées chez l'animal, du protocole mis en œuvre par Biotrial, des symptômes observés chez les volontaires sains de l'essai et des données de pharmacodynamie et de pharmacocinétique. La seconde partie explorera les hypothèses qui pourraient expliquer l'accident survenu à Rennes. Une conclusion résumera les avis et positions du CSST sur les points-clefs du dossier. Le rapport se terminera sur les recommandations, touchant à la conduite des études de première administration à l'homme, que le CSST souhaite voir porter au plan européen et international.

4. Rappel sur le système endocannabinoïde

Le BIA 10-2474 est un inhibiteur de la FAAH, hydrolase à sérine dégradant l'anandamide, l'un des principaux médiateurs du système dit endocannabinoïde. Ce système, à la dénomination ambiguë (il est de fait beaucoup plus large et complexe que les cibles d'action des dérivés du cannabis) existe chez un grand nombre d'espèces (vertébrés et invertébrés, à l'exception des insectes) et, en particulier, chez les mammifères. Il est de connaissance récente (le premier récepteur a été identifié par clonage en 1990) et encore incomplète.

On distingue deux types de récepteurs (CB1 et CB2), transmembranaires et couplés aux protéines G (inhibant l'adénylcyclase).

- CB1 est un récepteur présynaptique très ubiquitaire retrouvé à la surface de plusieurs types de cellules (neurones, astrocytes, péricytes, cellules endothéliales) et dans un grand nombre de localisations cérébrales (ganglions de la base, cervelet, hippocampe, cortex cérébral, bulbe olfactif, etc.). Le CB1 est l'un des récepteurs couplés aux protéines G dont le taux d'expression est le plus élevé dans le système nerveux central, à l'exception notable du tronc cérébral. On retrouve également le CB1 en périphérie (poumons, intestin, testicules, utérus, etc.). L'agoniste exogène type de ce récepteur est le tétrahydrocannabinol (THC).
- CB2 est principalement retrouvé au niveau des cellules du système immunitaire (effets immunomodulateurs).

A ce jour, huit endocannabinoïdes ont été identifiés. Ce sont des lipides bioactifs agissant à la fois comme neuromédiateurs et neuromodulateurs et synthétisés et libérés « à la demande » contrairement aux neuromédiateurs classiques qui sont libérés à partir de vésicules de stockage.

Les trois principaux endocannabinoïdes sont :

- l'anandamide (AEA) ; historiquement, il s'agit du premier endocannabinoïde caractérisé (1992),
- le 2-arachidonylglycérol (2-AG), ester de l'acide arachidonique,
- le 2-AG éther (éther de l'acide arachidonique).

Comme le THC, l'AEA a une affinité préférentielle pour le récepteur CB1 et très faible pour le CB2. A l'inverse, le 2-AG a une forte affinité pour les deux types de récepteurs, il peut donc être vu comme le médiateur principal du système endocannabinoïde alors que l'AEA n'a pratiquement pas d'action sur le CB2 et est capable d'interagir avec plusieurs autres systèmes. De plus, le 2-AG est retrouvé à des taux 200 à 800 fois plus élevés que l'anandamide chez les rongeurs.

Contrairement au 2-AG, l'anandamide est donc peu spécifique du système endocannabinoïde *stricto sensu* et peut également être considéré comme un endovanilloïde. En effet il est capable d'activer les récepteurs de type TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) qui sont des canaux cationiques non sélectifs de la famille des canaux TRP.

De plus, l'AEA agit sur d'autres systèmes :

- il est un bon agoniste des PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) alpha et gamma, récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme énergétique et l'inflammation,

- il interagit au niveau des récepteurs du glutamate de type NMDA (N-méthyl D aspartate), à la fois comme stimulateur par action directe et comme inhibiteur par une action indirecte *via* le CB1,
- enfin, comme d'autres endocannabinoïdes, il peut, par la voie de la MAP-kinase et une réaction en chaîne, aboutir à l'activation de multiples facteurs de transcription impliqués dans les phénomènes de neuroprotection ce qui constitue une voie de recherche très prometteuse.

Les effets de la stimulation du système endocannabinoïde s'apparentent à ceux induits par les dérivés du cannabis. Des concentrations faibles à moyennes induisent des réponses comportementales mélangeant effets stimulateurs et déprimeurs alors qu'aux doses élevées, les effets sont toujours de type déprimeur. Schématiquement, on observe alors chez l'animal :

- une antinociception,
- une hypothermie,
- une hypolocomotion.

La mémoire de travail est altérée, sans effet sur la mémoire de référence. L'effet sur le niveau d'anxiété est biphasique : anxiolyse aux faibles doses et anxiogénèse aux doses élevées.

Au niveau de la transmission synaptique, les endocannabinoïdes agissent de manière rétrograde (de l'élément post-synaptique neuronal vers le pré-synaptique) et ont globalement pour effet de diminuer cette transmission et ce, à court (quelques secondes) ou à long-terme (plusieurs heures ou jours). Ils modulent à la fois les transmissions excitatrices (glutamatergiques) et inhibitrices (GABAergiques).

Après avoir été synthétisé et libéré par le compartiment post-synaptique, l'AEA est normalement dégradé par la FAAH (hydrolase membranaire) qui dégrade aussi en partie le 2-AG mais également un assez grand nombre d'autres lipides bioactifs.

Contrairement à l'animal, deux isoformes de FAAH (FAAH-1 et FAAH-2) peuvent exister dans l'espèce humaine. La prévalence des porteurs des deux isoformes serait de l'ordre de 38% dans la population générale et celle des porteurs de la seule isoforme à faible activité (FAAH2) de 5%.

En cas d'inhibition de l'activité de la FAAH, les concentrations de AEA augmentent mais une voie de dégradation annexe prend le relais : celle des cyclo-oxygénases. Ceci aboutit à la formation d'eicosanoïdes : leucotriènes et prostanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, prostacyclines) pouvant agir sur les phénomènes d'apoptose et de vasomotricité ; l'effet vasoconstricteur au niveau cérébral du 20-HETE (acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque) est, par exemple, connu.

5. Examen de la molécule BIA 10-2474

L'examen de la structure chimique de cette molécule n'évoque *a priori* rien de particulier, notamment quant à une toxicité potentielle. Les groupements fonctionnels et noyaux chimiques qu'elle comporte se rencontrent couramment en chimie médicinale. Par exemple, la fonction *N-oxyde* est retrouvée dans le chordiazépoxyde (benzodiazépine anxiolytique), le minoxidil (agoniste des canaux potassiques développé comme

antihypertenseur et secondairement utilisé pour développer la pilosité), et dans divers antirétroviraux.

L'originalité du BIA 10-2474 est, du reste, relative ; il peut être considéré comme une « variation » autour de molécules antérieurement développées comme inhibiteurs de la FAAH. Par exemple, le PF-3845 de Pfizer contient également un noyau pyridine directement adjacent à la fonction urée. Ce composé, efficace *in vivo* et sélectif, s'est avéré être un inhibiteur puissant de la FAAH, bien toléré lors des essais cliniques de Phase I, mais sans efficacité thérapeutique satisfaisante durant ceux de Phase 2. De même, le noyau *imidazole*, courant en chimie pharmaceutique, est présent dans les composés développés par Bristol-Myers Squibb (inhibiteurs de type carbamate). Cependant, dans le cas du BIA 10-2474, ce noyau est en position adjacente au site électrophile de la molécule ce qui (voir plus loin) en fait potentiellement un « groupe partant ».

Tous les inhibiteurs de la FAAH ainsi développés reposent sur la formation d'une liaison covalente entre la sérine 241 de l'hydrolase et le carbone électrophile du carbamate ou de l'urée. L'inhibition de la FAAH peut donc être considérée comme irréversible. Selon les indications du Laboratoire Bial, le BIA 10-2474 se lierait bien à la FAAH de façon covalente (donc irréversible) *in vitro* mais de façon partiellement réversible *in vivo*. Ceci a déjà été rapporté dans le cas de l'inhibiteur de Janssen & Janssen (JNJ-42165279) avec lequel une partie de l'activité enzymatique est retrouvée au bout de 8 heures.

Une différence importante du BIA 10-2474 avec la majorité des inhibiteurs déjà connus concerne sa **faible spécificité** pour son enzyme cible. Les concentrations inhibant à 50% l'activité de la FAAH (IC₅₀) sont, en moyenne, de 1,7 (1,5 – 1,9) micromolaire (μM) chez la souris et de 1.1 (0,9 – 1,3) μM chez le rat. Elles seraient, selon les documents fournis par le Laboratoire Bial, au maximum, 100 fois plus fortes pour les diverses autres enzymes vis-à-vis desquelles le BIA a été testé. Le Laboratoire Bial n'a de fait testé son composé et l'un de ses métabolite (BIA 10-2445) que vis-à-vis de trois hydrolases à sérine : la monoacylglycérol lipase (MAGL), une carboxyl-estérase et une acétylcholine-estérase (sélectivité de 10 pour la FAAH du rat, soit 50 pour la FAAH humaine). Les autres enzymes testées ont été : la dopamine-béta-hydroxylase, la glutamic acid décarboxylase, les monoamine oxydases A et B et la choline-acétyl transférase.

Ceci contraste avec les résultats obtenus avec d'autres composés comme le PF-04457845 de Pfizer (testé vis-à-vis de 68 récepteurs) qui présente une CI₅₀ de 7,2 nanomolaire (nM) pour la FAAH humaine (soit 240 fois plus faible que celle du BIA 10-2474) et de plus de 100 μM pour un panel d'une vingtaine d'hydrolases. Le ratio de spécificité du composé Pfizer est ainsi, non plus de 100, mais de l'ordre de 14 000. Il en va de même pour le JNJ-42165279 de Janssen & Janssen testé vis-à-vis de 50 enzymes. Cette faible affinité/spécificité du BIA pour son enzyme-cible amènera plus loin à envisager une fixation « parasite » sur d'autres hydrolases à sérine lors de la discussion du mécanisme de la toxicité observée chez l'homme. Rappelons que la superfamille d'hydrolases à sérine compte environ 300 membres et qu'il est, de ce fait, recommandé de développer des inhibiteurs ayant la plus forte affinité possible pour l'enzyme ciblée. Un criblage protéomique aurait probablement apporté des informations pertinentes sur ce plan.

Neuf métabolites supposés du BIA 10-2474 ont été synthétisés (composés BIA 10-2639, 10-2583, 10-3258, 10-3827, 10-2445, 10-2631, 10-3844, 10-2580 et 10-3764). Tous

présentent une structure très proche de celle de la molécule mère. Ils correspondent, soit à la réduction du N-oxyde, soit à une hydroxylation du noyau cyclohexane (ce qui aboutit à la formation de composés plus hydrophiles), soit à la déméthylation de la fonction amine, soit à deux modifications concomitantes. *A priori*, rien dans ces métabolites ne laisse présager, à l'examen de leur structure chimique, une toxicité éventuelle. Trois d'entre eux présentent un potentiel d'inhibition de la FAAH proche de celui de la molécule-mère. Ces métabolites sont, pour la plupart d'entre eux, retrouvés en très faibles quantités, y compris après 14 jours d'administration du BIA 10-2474 chez l'animal. Le BIA 10-2631 (obtenu par réduction du N-oxyde et hydroxylation du cyclohexane), est cependant retrouvé en quantité plus importante chez le primate.

Lors des études de pharmacocinétique menées chez l'homme (voir plus loin), quatre de ces métabolites ont été identifiés, 2 indétectables et 2 mesurés à des concentrations plasmatiques très inférieures à celles de la molécule mère (<3%).

Sauf à supposer l'existence d'un métabolite fort différent, ou d'une distribution très importante en faveur des tissus (ratio concentration tissulaire/concentration plasmatique très élevé, expliquant les faibles concentrations circulantes), l'implication de ces métabolites dans la toxicité observée lors de l'essai clinique de Rennes paraît peu probable.

Sur un autre plan, rappelons que le cycle imidazole de la molécule BIA 10-2474, en position adjacente au carbone électrophile, site de liaison à la FAAH, peut être considéré comme un « groupe partant » pouvant donner naissance à un isocyanate sur lequel beaucoup de protéines cérébrales seraient susceptibles de se fixer.

Mis au contact de microsomes hépatiques, le BIA 10-2474, du moins jusqu'à la concentration de 30 µg/mL, n'inhibe que peu les cytochromes P450 2D6 et 3A4 et ne semble pas inhiber les cytochromes P450 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 et 2E1. Il ne semble pas agir comme inducteur, du moins sur les cytochromes P450 des séries 2B et 3A, avec un doute pour le 1A2.

6. Données pharmacodynamiques précliniques

Vis-à-vis de l'inhibition de la FAHH (mécanisme présenté comme central pour son activité pharmacologique), on peut considérer le BIA 10-2474 comme un composé :

- *D'activité relativement faible.* L'inhibition à 50% de la FAAH *in vitro* demande, par exemple, des concentrations dans le milieu de l'ordre du micromolaire alors que pour la majorité des inhibiteurs développés à ce jour, on se situe au niveau du nanomolaire. Ainsi que mentionné plus haut, l'IC₅₀ du BIA 10-2474 pour la FAAH apparaît 240 fois plus élevée que celle du PF-04457845 de Pfizer, certains inhibiteurs étant caractérisés par des IC₅₀ encore plus faibles.
- *Peu spécifique.* Une inhibition (toujours *in vitro*) d'autres enzymes est obtenue pour des concentrations 50 à 100 fois celles inhibant la FAAH. Il est possible (ceci n'ayant pas été testé) que ce ratio soit encore plus faible vis-à-vis d'autres hydrolases cérébrales. A titre de comparaison, ce ratio est, nous l'avons vu, de l'ordre de 14 000 pour le PF-04457845.
- *D'action peu progressive.* Les courbes doses-effet (ici l'inhibition de l'activité de la FAAH) du BIA 10-2474 ont ceci de particulier que l'on passe dans une plage de concentrations inhabituellement étroite de l'absence d'inhibition à une inhibition

quasi totale. Même s'il convient de tenir compte de la variabilité expérimentale, la pente de la courbe dose-effet paraît donc élevée, très raide, si on la compare à celles d'autres inhibiteurs enzymatiques et, plus généralement, à d'autres médicaments.

- *D'action prolongée.* Même si l'on considère que le BIA 10-2474 n'est pas typiquement un inhibiteur irréversible, l'inhibition de la FAAH qu'il entraîne est extrêmement prolongée. Elle est encore quasi-complète au bout de 8 heures. Chez l'homme, cette inhibition se poursuit très largement au delà de 24 heures, alors que les concentrations plasmatiques du BIA sont devenues inférieures à la limite de quantification de la méthode analytique utilisée (c'est à dire non mesurables).

Concernant la dose à partir de laquelle le BIA inhibe l'activité de la FAAH, il existe apparemment une discordance importante entre ce qui pourrait être extrapolé à partir des études animales et ce qui a été observé chez les volontaires de l'essai de Rennes. Les données animales montrent qu'à partir d'une dose de 0,3 mg/Kg chez le singe, on atteint l'effet maximal ; une dose de 1 mg/Kg ne permettant pas de majorer l'inhibition de la FAAH, ni les concentrations d'anandamide. Ceci (calcul non détaillé dans ce rapport, mais vérifié par le CSST) permettait de prédire qu'une inhibition totale de la FAAH serait obtenue chez l'homme pour une dose administrée située entre 10 et 40 mg. Or, on observe chez les volontaires de l'essai Biotrial qu'environ 50% d'inhibition est obtenue pour une dose de 0,25 mg et pratiquement 100% pour une dose de 5 mg. Ceci correspond à un ratio d'au moins 10 entre la dose estimée à partir des données animales et celle mesurée chez l'homme.

Comme mentionné précédemment, l'inhibition obtenue est extrêmement prolongée car la récupération de l'activité n'est pas complète 72 heures après administration, alors que le produit a quasiment totalement disparu au niveau du plasma.

En ce qui concerne l'activité analgésique du BIA 10-2474 (potentialité thérapeutique *a priori* privilégiée), deux tests, classiquement utilisés pour tester cette potentialité, ont été pratiqués chez la souris :

- Le *Formalin paw test*. Ce test consiste en l'injection d'une solution de formol à 5% dans l'extrémité plantaire de la patte postérieure. Cette agression entraîne une douleur persistante motivant des léchages réflexes répétés de la part du rongeur. L'efficacité de la molécule à l'étude est évaluée par la diminution du nombre de léchages (*licking score*) au cours d'une période (ici : 15 à 50 minutes) suivant l'injection. Trois doses de BIA 10-2474 (0,3 mg, 1 mg et 3 mg/Kg) ont été comparées, soit administrées seules, soit en association avec 5 mg/Kg d'AEA, également été administré seul. La gabapentine, à la dose de 300 mg, a été utilisée comme analgésique de référence pour cette comparaison ; ce dérivé de l'acide gamma-aminobutyrique est utilisé comme anti-épileptique et dans les douleurs chroniques.

Sur ce test, l'effet du BIA 10-2474 utilisé seul apparaît prolongé mais d'amplitude modeste. En effet, pour les trois doses croissantes, et comparativement au solvant inactif, le score diminue, respectivement de 29%, 28% et 41%. L'effet de l'AEA seul est du même ordre de grandeur (35%). En revanche, on observe un effet marqué et dose-dépendant pour l'association BIA + AEA, les scores

diminuant de 42% pour l'association avec 0,3 mg/Kg de BIA, de 65% pour l'association avec 1 mg/Kg et de 86% pour l'association avec 3 mg/Kg. Sur ce test, la gabapentine apparaît nettement plus efficace que le BIA puisque la variation est de 76% contre 41% pour le BIA seul à sa plus forte dose.

Notons que dans la Brochure Investigateur la figure correspondante (4.6) est doublement erronée par rapport au document source fourni par l'investigateur (Porsolt & Partners, Rapport n° 09.770/2, 2010): l'axe vertical fait figurer des secondes alors qu'il s'agit de valeurs de score et la colonne correspondant au score de la gabapentine (pourtant présentée comme référence pour ce test comparatif) a été supprimée de l'histogramme.

- Le *Tail flick test* (rétraction réflexe de la queue agressée par une source de chaleur). Pour ce test, une dose nettement plus forte de BIA 10-2474 (10 mg/Kg) a été utilisée. L'effet antinociceptif est maximal à la huitième heure mais, comme dans le test précédent, d'amplitude modeste (le délai de rétraction passant, en moyenne, d'environ 4,8 secondes à pratiquement 6, soit une différence de 1,2 seconde) mais prolongé (une différence persistant à la 72ème heure). Sur la base du même test, le BIA et l'URB 597 (inhibiteur de la FAAH de la famille des carbamates), tous deux administrés à la dose de 1 mg/Kg, ont été comparés vis-à-vis de la potentialisation de l'effet analgésique de l'AEA. Cette potentialisation n'était observée qu'avec le composé Bial.

Les doses utilisées dans ces tests diffèrent grandement (de 0,3 à 10 mg/Kg), sans qu'il soit possible de tracer courbe dose-effet ni d'estimer une dose efficace 50 (ce qui est une lacune surprenante). On note que :

- L'activité antinociceptive du BIA 10-2474 reste modeste quand la molécule est administrée seule (conditions supposées pour sa future utilisation thérapeutique). Le BIA potentialise en revanche fortement l'action antinociceptive de l'AEA.
- Cette activité antinociceptive du BIA augmente peu (score variant de 29% à 41%) quand on passe de 0,3 à 3 mg/Kg, pour le test au formol c'est à dire quand on majore la dose d'un facteur de 10. Ceci pourrait signifier que l'inhibition de l'enzyme impliquée dans cet effet est presque totale dès la dose de 0,3 mg/Kg et, donc, que l'éventail des doses testées, trop réduit et/ou mal choisi, ne permettait pas de déterminer une dose efficace de manière précise. Ceci constituerait une autre lacune problématique vis-à-vis du rationnel des choix de doses lors des étapes de développement ultérieur.
- L'activité antinociceptive ou potentialisatrice de l'AEA par le BIA 10-2474 est, en revanche, très nette et prolongée, quelle que soit la dose testée.

La relative pauvreté des données de pharmacologie par rapport aux autres études précliniques justifiera une recommandation du CSST pour ce qui concerne le développement de nouveaux médicaments.

7. Données de toxicologie animale

7.1. Remarque préalable

L'interprétation des données des études de toxicologie est toujours complexe. Ces études sont conduites avec des doses pouvant être très élevées, sans commune mesure avec celles utilisées chez l'homme. De ce fait, aux plus fortes doses, des manifestations toxiques diverses, souvent aspécifiques, ou visibles (en macroscopie ou microscopie) seulement après sacrifice, sont observées chez la majorité des animaux.

Lors d'un accident du type de celui de Rennes, il existe donc une forte probabilité que l'on retrouve, *a posteriori*, dans l'ensemble des données animales des éléments semblant cohérents avec le type de toxicité recherchée. Ceci ne signifie nullement que ces éléments constituaient des signaux prédictifs d'une toxicité de ce type. Pour éviter ce biais d'interprétation classique, le CSST a examiné avec attention le dossier, particulièrement vaste, des études menées chez l'animal ; celui-ci devant être vu dans son ensemble et dans son contexte.

7.2. Dossier de toxicologie

Les études menées avec le BIA 10-2474 semblent avoir été réalisées selon les protocoles actuellement validés (recommandations ICH notamment), avec un produit très pur (plus de 99,9%), identique à celui utilisé pour la confection des gélules administrées aux volontaires du centre Biotrial.

Ces études ont concerné, ce qui est très peu fréquent (surtout pour une molécule non particulièrement innovante), quatre espèces différentes (rat, souris, chien et singe) et ont été menées dans deux centres de bonne réputation : Harlan Laboratories SA en Espagne (études chez les non-rongeurs) et AnaPath GmbH en Suisse (études chez les rongeurs).

Une autre espèce (lapin) a été, de plus, utilisée pour les études concernant les effets éventuels du BIA 10-2474 sur la fertilité et la reproduction.

Lors de son audition par le CSST le 18 mars 2016, le Laboratoire Bial a expliqué que ce programme de toxicologie particulièrement développé était lié à un décalage dans le démarrage du développement clinique, ceci ayant permis de mener des études de toxicologie supplémentaires ou poursuivies après la première administration à l'homme (études de cancérogénèse par exemple). De fait, le CSST n'a pas retrouvé, dans l'ensemble des données qu'il a eu à analyser, d'élément pouvant accréditer l'hypothèse que ce programme de toxicologie particulièrement complet et coûteux avait été entrepris du fait d'un doute sur la bonne tolérance de la molécule.

Sur la base des données qui ont pu être analysées à ce jour et d'une manière générale, et jusqu'aux très fortes doses, on ne note pas de toxicité du BIA 10-2474 ciblée sur un organe particulier et qui aurait dû être prise en compte en tant que signal. L'un des effets toxiques le plus souvent retrouvé chez les animaux traités, comme pour plusieurs autres inhibiteurs de la FAAH, touche les spermatozoïdes et d'une manière plus générale, les gamètes. Ce point, sans doute le plus net du dossier, devrait être pris en compte si le BIA 10-2474 était amené à être utilisé comme médicament.

On note que le Laboratoire Bial, contrairement à ce qui a été fait pour plusieurs autres inhibiteurs de la FAAH, n'a pas défini d'organe(s) cible(s) dans son programme de toxicologie.

La sensibilité des méthodes de dosage utilisées lors des études de toxicologie ne permettait d'identifier en périphérie (compartiment plasmatique) que cinq métabolites

parmi les neufs auxquels le BIA 10-2474 peut donner naissance. Ces métabolites sont *a priori* identiques à ceux retrouvés chez l'homme et également produits en quantités très faibles (de l'ordre de 1% du produit parent), ceci pour les quatre espèces. De ce fait, aucune étude de toxicité spécifique à ces métabolites n'était réglementairement obligatoire et n'a, de fait, été conduite.

On ne note pas d'accumulation du produit, ni de ses métabolites, au cours des études avec doses répétées (sur 13 semaines).

Les doses NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*) et NOEL (*No Observable Effect Level*) semblent avoir été définies de manière correcte. Elles varient selon les espèces testées et, fait intéressant, selon la durée des administrations, surtout chez la souris. Les NOAEL pour les études 4 semaines et 3 mois, sont ainsi, respectivement, de :

- 100 et 25 mg/Kg/24h chez la souris,
- 30 et 10 mg/Kg/24h chez le rat,
- 50 et 20 mg/Kg/24h chez le chien,
- 100 et 75 mg/Kg/24h chez le singe.

Sur les bases des NOAEL ainsi calculées, et en se référant aux procédures de la Food and Drug Administration (FDA), il était, *a priori*, logique de tester une dose allant jusqu'à 100 mg chez l'homme (96 mg selon le calcul fait par le CSST).

Comme dans tout protocole de toxicologie, les organes des animaux prévus au protocole (40 organes) ont été systématiquement examinés macroscopiquement et microscopiquement, sans que, selon les rapports des centres d'étude, une toxicité notable pour un organe particulier, *a fortiori* commune aux quatre espèces étudiées, ait été observée. Ceci est également vrai pour le système nerveux, tant central que périphérique, et notamment chez le primate.

Cependant, chez le rat et la souris, des atteintes cérébrales, notamment au niveau des hippocampes avec une gliose et une infiltration par des cellules inflammatoires ont été notées chez trois animaux traités avec de très fortes doses. Ceci concerne un mâle et une femelle dans l'étude souris à 500 mg/Kg/24h sur 4 semaines et un rat de l'étude 150 mg/Kg/24h sur 4 semaines. Ces atteintes, discutées en CSST du fait du contexte, semblent assez fréquemment observées chez les rongeurs lors d'études de ce type et n'étaient *a priori* pas de nature à générer un signal bien que de telles atteintes ne semblent pas avoir été observées avec d'autres inhibiteurs de la FAAH. Pour les trois animaux concernés, comme pour leurs congénères du même groupe, les rapports d'observation ne mentionnent pas l'existence de troubles neurologiques ou du comportement.

De même, chez le primate et le rat, des atteintes au niveau cérébral et, surtout, au niveau du système nerveux autonome ont été notées chez quelques animaux traités à forte dose. Ainsi, chez le singe, lors des études sur 4 semaines menées avec des doses de, respectivement, 10, 50 et 100 mg/Kg/24h des atteintes de la *medulla oblongata* (bulbe rachidien) à type d'«*axonal dystrophy*» ont été notées chez quelques animaux du groupe 100 mg/Kg/24h et non chez ceux recevant des doses inférieures. Il est difficile de se prononcer sur la nature histologique précise de cette atteinte du fait que les deux anatomopathologistes qui ont relu les lames de coupes pour le compte de Bial n'ont pas utilisé la même terminologie.

Toujours chez le singe, une toxicité clairement dose-dépendante (n'apparaissant que dans le groupe 100 mg/Kg/24h), et plus nette que la précédente, concerne une atteinte à type d'œdème des cellules du plexus de Meissner du tube digestif.

Dans le groupe de chiens (beagles) traités 13 semaines, l'attention du CSST a été attirée par la présence d'altérations pulmonaires clairement visibles en macroscopie, confirmées en microscopie et étiquetées « broncho-pneumopathie/alvéolite aigüe focale et multifocale ». Ces manifestations, semblent surprenantes par leur fréquence. Le rapport de toxicologie remis par le Laboratoire Bial relie ces lésions à une inhalation bronchique de BIA 10-2474. Cette hypothèse a paru peu plausible à la majorité des experts du CSST. En effet, l'enveloppe des gélules administrées était prévue pour résister aux sucs gastriques ce qui rend très peu probable une ouverture et une inhalation de poudre. La même raison ainsi que le mode d'administration des gélules et l'absence de symptomatologie évocatrice rendent également peu plausible une régurgitation par « fausse-route » (expliquée par exemple par une toxicité neurologique du BIA 10-2474). Aucune hypothèse alternative (contamination infectieuse, susceptibilité particulière de ce groupe de chiens ou autre) n'a été privilégiée par le CSST pour cette manifestation qui est l'un des faits marquants du dossier de toxicologie du BIA 10-2474. Le lien avec l'existence d'une forte densité de récepteurs CB1 au niveau des poumons, ne peut, en l'absence d'investigations complémentaires, être considéré comme une explication à retenir. On note, de plus, l'absence de symptômes similaires dans les trois autres espèces (souris, rat, singe) et, apparemment, de manifestations semblables lors des études de toxicologie menées avec d'autres inhibiteurs de la FAAH, y compris chez des chiens de même provenance. Cette symptomatologie, clairement dose-dépendante, a notablement perturbé le plan d'étude prévu chez le chien. Celui-ci devait tester (*versus* témoins) sur 4 semaines des doses de 20, 50 et 100 mg/Kg/24h. Du fait de manifestations pulmonaires importantes (deux chiens, un mâle et une femelle, du groupe forte dose ont du être sacrifiés avant le terme de l'étude) et de signes d'incoordination motrices, les doses ont du être réduites dans les groupes 50 et 100 mg/Kg/24h pour pouvoir mener l'étude à son terme. De fait, la dose de 20 mg/Kg/24h a été considérée comme la NOAEL. Cette impossibilité de tester les plus fortes doses pourrait expliquer le recours à une autre espèce : le singe qui constituait, *a priori*, un modèle plus adapté pour l'étude d'un inhibiteur de la FAAH (meilleure sensibilité à la stimulation du système endocannabinoïde) même si cela ne s'est pas révélé être le cas au plan du calcul des doses. Il semble cependant que les études chien et singe aient débuté à la même période

Diverses études ont, de fait, été menées chez le primate (*cynomolgus* ou macaque). Peut être du fait de ce qui avait été observé chez le chien, ces études ont été précédées (à la différence de ce qui s'est pratiqué pour d'autres inhibiteurs de la FAAH) d'une phase de montée progressive des doses par paliers (*up-titration*). Celle-ci visait à obtenir, selon le Laboratoire Bial, une « stabilisation du système endocannabinoïde » en surveillant l'apparition de manifestations évocatrices comme l'hypothermie (l'examen du dossier montre cependant que celle-ci n'a jamais excédé 1 degré Celsius), une hypolocomotion ou la baisse de la prise alimentaire, etc.

Aucune mortalité n'a été observée lors de l'étude long terme (13 semaines à 75 mg/Kg après montée des doses par paliers). En revanche, dans un autre groupe, une femelle est décédée après une escalade de doses sur 12 jours (10, 25 et 50 mg/Kg/24h) suivie de 9

jours d'administration du BIA à 75 mg/Kg/24h. Le dossier n'indique rien de particulier concernant cet animal.

De même, plusieurs primates ont du être sacrifiés « *for ethical reasons* » lors des études en doses ascendantes visant à tester la tolérance du produit à très fortes doses : les deux animaux du Groupe 1 au quatrième jour du palier terminal à 250 mg/Kg, les deux animaux du Groupe 2 (125 mg/Kg/24h) et une femelle du Groupe 3 après trois administrations de 60 mg/Kg/24h, les autres animaux ayant survécu jusqu'au bout de l'escalade jusqu'à 110 mg/Kg/24h. Ces décès prématurés chez le primate sont cependant survenus pour des doses répétées très élevées qui correspondraient en doses équivalentes humaines (*Human Equivalent Doses* ou HED), respectivement, à 78 mg/Kg, 39 mg/Kg et 34 mg/Kg. A titre purement indicatif, une HED de 78 mg/Kg correspondrait à environ 100 fois la dose la plus forte ayant pu être testée chez l'homme en administrations répétées (50 mg).

Lors de l'audition du 18 mars, le Laboratoire Bial a indiqué avoir mis en projet une étude de toxicologie du BIA 10-2474 chez le singe à long terme (52 semaines).

Le dossier des études animales du BIA 10-2474 semble globalement de bonne qualité et aucun élément dans les données que le CSST a étudié ne constituait un signal de nature à contre-indiquer un passage chez l'homme. Ceci est notamment vrai pour la toxicité d'expression neurologique avec des atteintes du système nerveux central et du système nerveux autonome ayant affecté un petit nombre d'animaux traités aux plus fortes doses. Ce caractère *a priori* non alarmant des atteintes neurologiques observées a été confirmé par l'examen des coupes des tissus concernés par les experts du CSST (photographies fournies par le Laboratoire Bial suite à une demande formulée par le CSST le 18 mars 2016).

Plusieurs commentaires méritent cependant d'être faits:

- Les raisons ayant pu conduire Bial à utiliser quatre espèces différentes (dont 2 rongeurs), ce qui est, pour un dossier de ce type, inhabituel (aucun autre inhibiteur de la FAAH ne semble avoir été étudié sur cette base) ont été longuement débattues au sein du CSST. Il est cependant possible que cela puisse être la conséquence d'une modification du plan d'étude en cours de développement: passage du chien au singe du fait de la mauvaise tolérance observée chez le premier (les études chien et singe semblent cependant avoir débuté pratiquement aux mêmes dates), décalage du plan de développement clinique (réponse officiellement apportée par le Laboratoire Bial). Il est également crédible que les études menées chez la souris aient été, en fait, destinées à déterminer les doses à retenir pour les études (long-terme) de cancérogénèse.
- Il convient d'être prudent en ce qui concerne les conclusions qui pourraient être tirées de la mise en rapport des doses testées chez les animaux à celles administrées au volontaires de l'essai Biotrial (en administration unique ou répétées). Pour comparer les densités d'exposition entre l'animal et l'homme, ce sont les rapports des concentrations plasmatiques et, plus précisément, des aires sous la courbe qu'il conviendrait d'utiliser. Quoiqu'il en soit, les doses utilisées chez l'animal ne justifiaient pas de réserve quant à la validité du dossier préclinique. Selon des données fournies par le Laboratoire à la demande du CSST, les rapports des aires sous la courbes animal/homme, quand les valeurs sont disponibles, sont proches de 1 à l'exception du singe chez lequel les marges sont

plus fortes (ratio d'environ 6). Ceci confirme que les extrapolations de l'animal à l'homme, en termes de marge d'exposition et de doses à tester, doivent considérer l'ensemble des espèces utilisées et non pas uniquement celle paraissant être le meilleur modèle au plan pharmacologique.

- Si elle ne permettait pas de dégager de signal quant à une toxicité spécifique, la tolérance du BIA 10-2474, lors des études de toxicologie, paraît globalement et clairement moins bonne que celle d'autres inhibiteurs de la FAAH antérieurement développés. En dehors du problème spécifique de la symptomatologie pulmonaire chez le chien, les autres inhibiteurs (malgré des ratios de doses parfois plus élevés que dans le cas du BIA) ne semblaient pas entraîner d'effets toxiques méritant d'être commentés. En particulier, les atteintes au niveau des plexus de Meissner chez le singe n'ont pas été retrouvées et aucun sacrifice avant terme n'a été nécessaire. Cette meilleure tolérance est, par exemple, attestée par le fait que pour l'un des produits, l'absence d'effet toxique observé a conduit à utiliser la dose la plus forte administrée pour définir la NOAEL.

8. L'essai clinique mené à Rennes par Biotrial

L'essai, de Phase 1 monocentrique, première administration à l'homme (*First in Humans* ou FIH) prévoyait d'impliquer au total 128 volontaires sains, hommes et femmes, âgés de 18 à 55 ans, et comportait quatre parties :

- une étude en doses uniques croissantes (SAD ou *Single Ascending Dose*),
- une étude en doses répétées croissantes (MAD ou *Multiple Ascending Doses*),
- une étude ouverte d'interaction avec les aliments, et
- une étude de pharmacodynamie (non réalisée).

On note que la dispersion des âges des volontaires recrutés (18-55 ans) est élevée, certains étant relativement âgés, par rapport à ce que l'on observe généralement dans des études de Phase 1, première administration à l'homme. Les âges variaient, par exemple, de 27 à 49 ans pour les six sujets hospitalisés au CHU de Rennes. On note, de plus, l'inclusion de plusieurs volontaires pouvant être considérés comme présentant un facteur de risque potentiel vis-à-vis de certains effets indésirables médicamenteux. On relève, entre autres, un espace PR mesuré à plus de 240 millisecondes sur plusieurs électrocardiogrammes en pré-dose et une pression artérielle supérieure à 140/90 mm Hg lors de quatre mesures en pré-dose.

Le choix de la première dose administrée (0,25 mg) pour la partie SAD a été prudent, car correspondant environ à 1/400ème de la dose la plus élevée sans effet toxique (NOAEL) chez l'animal.

La partie SAD¹ a impliqué 64 volontaires en huit cohortes de 8 volontaires (six recevant le *verum* et deux le placebo) correspondant aux 8 paliers de doses testés (de 0,25 mg à

¹ Pour mémoire, rappelons les recommandations de 2006 de l'Agence Française du Médicament (AFSSaPS) pour la première administration à l'homme (page 4) :

« Dans un même groupe :

- le nombre de volontaires recevant simultanément la nouvelle substance active. Il est nécessaire, sauf justification dûment étayée, de limiter le nombre de volontaires recevant simultanément la nouvelle

100 mg) ; 48 sujets ont donc été exposés au *verum*. Pour chaque palier, deux sujets (un *verum* et un placebo) étaient testés avant administration aux six autres.

La partie MAD prévoyait six cohortes de 8 volontaires (six *verum* et deux placebo), soit 48 sujets. Les six doses devant être testées étaient : 2,5 mg ; 5 mg ; 10 mg ; 20 mg ; 50 mg et 100 mg. Chaque dose devait être administrée 10 jours consécutifs. Les sujets de chaque cohorte devaient séjourner 15 jours (et 14 nuits) au centre Biotrial. A partir de la dose 10 mg, l'administration a été conditionnée aux données de pharmacocinétique mesurées à n-2 (soit, par exemple, celles de la cohorte 10 mg pour débiter l'administration de 50 mg). Comme c'est la règle en Phase 1, le passage au palier de dose supérieur était conditionné à l'absence de manifestation indésirable chez les volontaires du palier précédent après avis d'un comité de suivi. Sous cette condition, l'administration de la molécule se faisait, à la même heure, à l'ensemble des volontaires de la cohorte. Selon le protocole, une manifestation d'intolérance notable (« *severe* ») observée chez 4 volontaires de la cohorte (soit 50% de l'effectif) devait entraîner l'interruption de l'essai. Du fait de l'accident survenu chez les volontaires de la cohorte MAD n°5, seulement 30 volontaires (sur les 36 prévus) ont reçu le *verum* pour cette partie de l'essai en administrations répétées.

La recherche d'interaction avec l'alimentation a impliqué 12 volontaires à la dose de 40 mg.

Ce sont donc, au total, 90 sujets qui ont été exposés au BIA 10-2474 au cours de cette essai, ceci à des doses très différentes (de 0,25 à 100 mg, soit un ratio de 400), que ce soit en dose unique ou en administrations quotidiennes répétées.

La partie SAD (dose unique) a débuté le 9 juillet 2015 pour se terminer (cohorte 8 : 100 mg) le 9 octobre 2015.

La partie MAD (10 jours de traitement) a été lancée le 6 octobre 2015. L'avant-dernière cohorte prévue (cohorte n°5, soit 50 mg) a débuté le 6 janvier 2016 soit 19 jours après la fin de la cohorte n°4 (20 mg).

On note donc un chevauchement de trois jours entre les deux programmes. Ceci était nullement problématique du point de vue de la sécurité du fait de la faiblesse (2,5 mg) de la première dose testée en MAD.

Le soir du cinquième jour (le 10 janvier 2016) et donc de la cinquième administration dans la cohorte MAD 50 mg (dose cumulée de 250 mg), l'un des 6 volontaires ayant reçu le *verum* est hospitalisé au CHU de Rennes dans un état sérieux. La société Biotrial n'a *a priori* pas considéré le lien entre la symptomatologie aigue présentée par ce sujet et la molécule testée comme possible puisque les autres volontaires ont reçu leur sixième dose le lendemain matin, 11 janvier à 8 heures (dose cumulée : 300 mg), sans attendre les résultats des explorations (IRM notamment) en cours sur le volontaire hospitalisé. Les 5 volontaires *verum*, et non les deux sujets sous placebo, ont été successivement

substance active en fonction des facteurs de risque identifiés.

- le délai prévu entre l'administration à un volontaire et l'administration au suivant. Un délai d'observation suffisant doit être prévu entre les administrations, fonction notamment des caractéristiques du produit, des données disponibles (pharmacocinétique, pharmacodynamique) et des facteurs de risque identifiés,
- les critères d'administration au volontaire suivant,
- les critères d'arrêt des administrations aux volontaires non encore traités ».

hospitalisés au CHU de Rennes entre le 13 et le 15 janvier, soit 2 à 4 jours après cette dernière administration. La suspension de l'essai a été effective le 11 puisque les administrations, qui devaient se poursuivre jusqu'au 15, ont été interrompues à partir de cette date.

Plusieurs remarques sur cette partie cruciale méritent d'être faites :

- L'essai de Rennes a été mené dans un centre spécialisé (Biotrial) de bonne réputation. Hormis la réserve exprimée plus haut sur le recrutement des volontaires, l'essai s'apparente aux plans privilégiés à l'heure actuelle pour une première administration à l'homme/Phase 1. En particulier, et contrairement à ce qui a pu être dit de manière erronée par plusieurs vecteurs d'information, il n'y a pas eu de chevauchement temporel entre les différentes cohortes, notamment en MAD. Au contraire, un laps de temps était prévu entre la fin d'une cohorte et le début de la suivante.
- Bien que ce ne soit pas spécifique de cet essai, on ne peut que s'étonner, surtout s'agissant d'une molécule agissant *via* le système nerveux central, que le bilan prévu pour la sélection, l'inclusion et le suivi des volontaires n'ait pas inclus une évaluation neuropsychologique avec entretien clinique et tests cognitifs. Une telle évaluation a été pratiquée, au moyen, entre autres, d'échelles adaptées, pour d'autres inhibiteurs de la FAAH. Ce point motivera l'une des recommandations du CSST.
- Le mode d'escalade de doses (progressions arithmétiques, géométriques et de Fibonacci, etc.) dans les essais dits de Phase 1 ne repose ni sur un consensus, ni sur des recommandations claires au plan international. Dans le cas de l'essai de Rennes, le mode de progression des doses apparaît clairement problématique car trop brutal en fin de progression alors que le bon sens aurait plaidé pour l'inverse. Par exemple, le saut de dose entre les cohortes MAD 4 et 5 (20 à 50 mg) correspond à un rapport de 2,5 alors qu'il n'est que de 2 (2,5 à 5 mg) entre les cohortes 1 et 2, zone dans laquelle le risque pouvait être considéré comme faible du fait du petit écart, en valeur absolue, entre les deux doses. La progression retenue à Rennes est, à la base, de type géométrique (par essence moins prudente que les progressions de type arithmétique et Fibonacci) avec une raison (facteur multiplicateur) de 2, de plus non respectée entre 20 et 50 mg. Ce type de progression ne semble pas avoir été utilisé lors des essais d'autres inhibiteurs de la FAAH. Il a paru important au CSST que la communauté scientifique et réglementaire se saisisse de cet aspect, majeur pour la sécurité des volontaires (voir recommandations en fin de rapport).
- Un point difficile à trancher dans le cas de l'essai de Rennes est celui du choix de la dose maximale prévue pour être testée chez les volontaires. Celle-ci a été fixée à 100 mg, que ce soit en administration unique ou répétée. Nous avons vu que ce choix apparaît *a priori* logique si l'on extrapole à l'homme les données mesurées chez l'animal : l'extrapolation des NOAEL amène à une estimation très proche (96 mg) et celle de la concentration inhibant la FAAH aboutit à une dose comprise entre 10 à 40 mg. S'agissant d'un produit non considéré à risque selon les critères habituellement utilisés (notamment par l'Agence Européenne du médicament), l'utilisation de la NOAEL chez l'espèce la plus sensible et non de la MABEL (*Minimal Anticipated Biological Effect Level*) était réglementairement justifiée. Le problème vient de la réponse apparemment très différente de l'homme sur ce dernier point. En effet, on observe que l'inhibition de la FAAH (mécanisme

allégué de l'activité pharmacologique du BIA 10-2474) est obtenue, chez l'homme, pour 1,25 mg et est quasi-complète à 5 mg. Dans ces conditions, choisir 100 mg revenait à tester une dose 20 à 50 fois supérieure à celle supposée efficace, ce qui semble résolument excessif, même si la règle, qui veut que l'on ne dépasse pas en première administration à l'homme une dose correspondant à la NOAEL, a été ici respectée. Ce point majeur en terme de sécurité ne pouvait pas être anticipé lors de l'approbation et de l'initiation de l'essai (seules les données animales étant connues). En revanche, il eut été logique et attendu que le plan d'escalade de doses soit revu à la lumière des données pharmacocinétiques recueillies chez les volontaires comme cela avait été prévu pour d'autres inhibiteurs de la FAAH. Cela n'a pas été le cas dans cette étude.

9. Symptomatologie observée chez les volontaires hospitalisés

Pour des raisons évidentes de protection et de droit au respect de la vie privée des personnes et de secret médical, les informations figurant dans le présent rapport ont été limitées aux éléments utiles dans l'optique de la mission du CSST et sont présentées de manière à respecter l'anonymat des volontaires.

L'un des dossiers des six volontaires de la cohorte MAD n°5 ayant été exposés au BIA 10-2474, n'a pas été retenu car la personne, examinée à titre systématique, ne se plaignait d'aucun symptôme particulier et son examen par IRM a seulement révélé une image interprétée comme « incidentalome ».

9.1. Symptomatologie clinique

Le premier volontaire a été hospitalisé dans la soirée du 10 janvier 2016, jour de la cinquième, administration du produit à l'essai. Deux autres volontaires ont été hospitalisés le 11 janvier (jour de la sixième administration), deux autres le 12 janvier (lendemain de la dernière administration) et le dernier volontaire le 13 janvier, soit deux jours après la dernière administration.

Les principaux symptômes cliniques relevés ont été :

- des céphalées, présentes chez les cinq volontaires, très sévères chez l'un mais ne survenant cependant pas en « coup de tonnerre »,
- des signes cérébelleux chez trois volontaires,
- des troubles de la conscience (chez trois volontaires) allant d'un ralentissement psychomoteur au coma (chez le volontaire décédé),
- des troubles mnésiques chez deux volontaires.

D'autres symptômes n'ont été notés qu'une seule fois : diplopie, paresthésies des cuisses, hémiparésie avec « tremblements » de l'hémicorps sans syndrome pyramidal, douleur et raideur du rachis.

Pour trois volontaires, l'évolution du tableau clinique initial s'est faite vers l'aggravation : le premier sujet hospitalisé est passé en état de mort encéphalique trois jours après le début des troubles. Pour les deux autres, le tableau s'est aggravé pendant trois à quatre jours avant une phase de stabilisation (de deux à trois jours), puis

d'amélioration. Ces deux volontaires gardaient cependant des troubles (essentiellement cérébelleux et mnésiques) à leur sortie du CHU de Rennes.

Pour les deux volontaires dont les troubles étaient mineurs ou, de ce fait, d'interprétation délicate, aucune aggravation n'a été notée ce qui a justifié leur sortie du CHU sans séquelle apparente.

Les quatre volontaires (hormis celui ayant décédé) ont été traités, à partir du 13 janvier, par méthylprednisolone (Solumédrol^o) à raison de 1g/24h, sans qu'il soit possible de savoir si cette corticothérapie à forte dose a joué un rôle dans l'amélioration du tableau clinique.

La présentation clinique des cinq sujets revêt un caractère remarquable du fait d'une symptomatologie purement neurologique traduisant une atteinte du seul système nerveux central (mais sans épilepsie), sans aucun symptôme suggérant une atteinte d'autres organes et sans le moindre signe infectieux. Hormis des épisodes de bradycardie et une instabilité hémodynamique chez le sujet décédé, aucune anomalie cardiaque ou tensionnelle n'a été notée.

Le profil évolutif de la symptomatologie neurologique et son caractère isolé vont à l'encontre d'un processus vasculaire, tumoral ou infectieux et ne sont guère compatibles qu'avec un processus inflammatoire, métabolique ou toxique.

9.2. Examens du sang et du liquide céphalo-rachidien (LCR)

Aucune anomalie métabolique, ni du bilan sanguin n'a été constatée chez les cinq volontaires. Le bilan immunologique effectué chez le plus sévèrement atteint s'est révélé négatif.

Le LCR a été examiné chez trois sujets. Il était normal chez l'un d'entre eux, siège d'une hyperprotéinorrhachie isolée chez un autre et très anormal, mais de façon non spécifique, chez le plus sévèrement atteint avec d'une hyperprotéinorrhachie et la présence de polynucléaires neutrophiles pouvant traduire une inflammation ou une nécrose tissulaire.

9.3. Résultats des explorations par IRM

Chez l'un des volontaires, l'IRM, effectuée 24 h après l'administration du produit à l'essai, a seulement permis de retrouver un minime hypersignal punctiforme du corps de l'hippocampe droit qui n'était plus présent sur les examens par IRM pratiqués deux et quatre jours plus tard.

Pour les quatre autres volontaires, l'IRM permettait de visualiser des anomalies d'intensité très variable intéressant, de façon **bilatérale et symétrique**, les hippocampes et le pont (protubérance) prédominant dans sa partie antérieure (s'étendant parfois au bulbe ou au mésencéphale). Chez le sujet décédé, et seulement chez lui, on notait, sur l'IRM pratiquée deux jours après l'examen initial, une atteinte des thalamus et du cortex cérébral.

Les anomalies observées étaient de même type, mais de sévérité variable, chez les quatre volontaires avec :

- 1. Un hypersignal en diffusion avec une baisse du coefficient de diffusion apparente (ADC) signalée une fois et indiquant une restriction de la diffusion de l'eau (pouvant témoigner d'un oedème cytotoxique, quelle qu'en soit la cause, mais aussi d'une infiltration cellulaire, inflammatoire par exemple). Chez le

volontaire le plus sévèrement atteint, l'hypersignal en diffusion s'accompagnait, dans la partie postérieure du tronc cérébral, d'une augmentation de l'ADC qui pourrait indiquer l'existence d'un œdème vasogénique.

- 2. Un hyposignal en SWI (*Susceptibility Weighted Imaging*), interprété dans le contexte comme traduisant la présence de sang (d'hémoglobine), sous la forme de multiples petits hyposignaux arrondis pouvant correspondre à des microhémorragies.
- 3. Un hypersignal Flair (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*), non spécifique, et pouvant être lié à une augmentation de la teneur en eau, une démyélinisation, une gliose ou une nécrose.

Ces anomalies de signal sont identiques dans les hippocampes et le pont chez les quatre volontaires, ainsi que dans le cortex cérébral chez le plus sévèrement atteint. Ceci suggère que l'atteinte corticale relève du même mécanisme et non d'une anoxie liée aux épisodes de bradycardie.

Les anomalies de signal observées reflètent donc la présence de modifications microstructurales comportant une composante vasculaire (microhémorragies) qui ne sont pas spécifiques d'un mécanisme donné. Toutefois, leur topographie bilatérale et symétrique et la présence d'hyposignaux très précoces en SWI permettent *a priori* d'exclure un processus inflammatoire. Cette même topographie, tout à fait singulière, rend peu probable un mécanisme microvasculaire primitif et est davantage compatible avec un processus toxique/métabolique.

9.4. Commentaires

Les circonstances de survenue, le caractère stéréotypé et le profil évolutif de l'atteinte neurologique suggèrent fortement la responsabilité du produit testé. Les anomalies visualisées par l'IRM, concordantes avec la symptomatologie clinique, suggèrent également fortement, du fait de leurs caractéristiques de signal et de leur topographie bilatérale et symétrique, un mécanisme toxique ou métabolique. L'imputabilité du produit à l'essai dans la survenue de l'atteinte neurologique apparaît donc certaine.

La topographie tout à fait inhabituelle (et peut-être même unique à ce jour) des lésions (hippocampes, pont, thalamus, cortex) est un élément clef pour la recherche du mécanisme par lequel la substance testée a pu générer de tels effets.

10. Recherche de signes de toxicité chez les autres volontaires

L'un des éléments les plus frappants du dossier BIA 10-2474 est l'absence de toxicité (de manifestation indésirable d'intensité notable, *a fortiori* grave), en particulier de type neurologique, observée chez les volontaires de l'essai autres que ceux de la cohorte MAD n°5. Ceci malgré des administrations en dose unique allant jusqu'à 100 mg ou des administrations 10 fois répétées allant jusqu'à 20 mg/24h, soit une dose cumulée de 200 mg (rappel : les doses cumulées chez les volontaires hospitalisés allaient de 250 à 300 mg).

Chez les 76 volontaires (hors cohortes MAD) ayant reçu le *verum*, on notait 18 manifestations indésirables, dont 11 (fréquence : 14,5%) de nature cardiovasculaire (hypotension artérielle orthostatique, tachycardie réflexe, allongement des espaces PR ou QT à l'électrocardiogramme, etc.), ainsi que des cas de vertiges ou céphalées peu sévères.

Les observations étaient du même type chez les volontaires des cohortes MAD avec l'absence d'événement de gravité ou de sévérité notable et une prédominance de symptômes cardiovasculaires. A noter cependant que deux volontaires de la cohorte MAD 10 mg avaient présenté, à deux reprises, une vision floue (*blurred vision*). Ces épisodes ayant duré, à chaque fois, entre dix et trente minutes ne peuvent être qualifiés, en l'état, de diplopie, symptôme qui correspond, en neurologie, à une définition séméiologique précise. De fait, cette manifestation n'a pas été considérée comme un événement pertinent par l'investigateur et le comité de suivi de l'étude et, du reste, pas été retrouvée chez les volontaires des cohortes exposés à des doses plus élevées.

Depuis la suspension de l'essai, l'ensemble des volontaires (en dehors de ceux de la cohorte MAD n°5) auxquels le BIA 10-2474 avait été administré ont été recontactés pour un bilan clinique complet et une exploration par IRM cérébrale. A ce jour, aucune anomalie, ni clinique, ni biologique, ni à l'IRM, pouvant être en rapport avec l'administration de la molécule et les conditions de l'essai n'a été décelée.

Les données de tolérance lors des études de première administration à l'homme d'autres inhibiteurs de la FAAH semblent avoir qualitativement le même profil (sédation, troubles digestifs, hypotension orthostatique, vertiges, etc.) avec cependant une différence: la fréquence des manifestations indésirables, quoique variant assez grandement d'un produit à l'autre, apparaît globalement plus faible que dans le cas du BIA 10-2474.

11. Données de pharmacocinétique

D'une manière générale, les études de pharmacocinétique menées chez l'animal n'appellent pas de commentaire particulier même si, comme c'est assez fréquemment le cas, la pharmacocinétique semble devenir non-proportionnelle, au moins chez le chien et le singe, avec les plus fortes doses. Par exemple, les ratios des aires sous la courbe (AUC) et des doses administrées, censés rester constants, sont de 960 à 0,1 mg/Kg et de 1886 à 1 mg/Kg.

Une étude avec administration (orale et intraveineuse) de produit marqué montre la très bonne diffusion du BIA 10-2474 et son très grand volume de distribution.

Les études de pharmacocinétique menées chez les volontaires des cohortes SAD montrent que la demi-vie d'élimination du BIA 10-2474 s'allonge progressivement quand les doses administrées deviennent élevées; les AUC, reflet de l'exposition, augmentent ainsi plus rapidement que l'augmentation des doses. Ceci, d'un point de vue purement théorique, pourrait s'expliquer par l'accélération de l'absorption au delà d'un certain seuil (type rupture de barrière, facilitation du passage, induction de transporteurs, etc.), ou, beaucoup plus vraisemblablement, par une saturation des processus d'élimination pour une dose administrée comprise entre 40 et 100 mg, sans

qu'il soit possible de situer précisément la dose seuil à partir de laquelle s'amorce la non-proportionnalité.

Lors des études en MAD, on observe le même phénomène, les AUC augmentant plus rapidement que les doses à partir de 20 mg. On remarque surtout que :

- La dispersion des paramètres pharmacocinétiques entre les volontaires influence fortement les valeurs individuelles des AUC, plus grandes à 50 mg qu'à 20 mg.
- Toujours pour 50 mg, et comme ce qui était déjà, mais moins nettement, observé pour 20 mg, les concentrations plasmatiques résiduelles de BIA 10-2474 continuent d'augmenter légèrement à la cinquième et sixième administration. Le plateau d'équilibre des concentrations plasmatiques ne semblant pas atteint pour certains sujets de la cohorte MAD n°5. Ceci suggère fortement que la demi-vie d'élimination du BIA 10-2474 est plus longue chez ces sujets que ce que permettaient de prédire les valeurs des demi-vies d'élimination calculées antérieurement pour des doses uniques ou des doses répétées inférieures (10 mg). Par exemple, la demi-vie d'élimination calculée dans le groupe SAD 100 mg était, en moyenne, d'environ 10 heures, valeur *a priori* incompatible avec ce qui a été observé dans les cohortes MAD 20 et 50 mg.
- Comme en SAD, la non-proportionnalité est donc vraisemblable à partir de 50 mg en doses répétées.

Les quatre métabolites identifiés chez l'animal sont attendus être les mêmes chez l'homme ; deux d'entre eux (BIA 10-2639 et BIA 10-2445) atteignent des concentrations plasmatiques mesurables mais restant cependant très faibles (<3% de celles du produit parent). En l'absence d'administration directe des métabolites eux mêmes, il est difficile d'en déterminer les caractéristiques individuelles. Cependant, il semble que la variabilité des paramètres pharmacocinétiques soit plus élevée pour ces deux métabolites que celle observée chez l'animal, avec, par exemple, une estimation (très approximative du fait des très faibles concentrations) de la demi-vie d'élimination variant de 4 à 23 heures.

Cette variabilité affecte également, mais de façon moindre, la pharmacocinétique de la molécule elle-même. Ceci est couramment observé avec les médicaments du fait de variations, entre autres de métabolisme, entre les individus ; certains (qualifiés d'*outliers*) pouvant, vis-à-vis de certains paramètres, se situer très à l'écart des autres membres du groupe. Dans le cas d'une étude de Phase 1, cette variabilité peut devenir problématique si les calculs de la dose à administrer se fondent, comme c'est le cas ici, sur les moyennes des mesures des paramètres clefs mesurés sur un petit nombre de volontaires des paliers de doses inférieures. Par définition, une telle approche ne prend pas en compte les valeurs extrêmes de sujets exprimant une réponse particulière dont la répartition peut varier d'un groupe à l'autre. Ceci peut être de nature à induire des erreurs de prédiction assez significatives (voir recommandations en fin de rapport).

12. Hypothèses étudiées pour expliquer l'accident de Rennes

L'accident survenu lors de l'essai du BIA 10-2474 au centre Biotrial de Rennes revêt un caractère indiscutablement stupéfiant et inédit de par :

- sa gravité (plusieurs volontaires de la même cohorte ayant du être hospitalisés, l'un d'entre eux étant décédé dans les jours suivant son admission),

- le fait, qu'apparemment, les études de toxicologie, pourtant menées sur quatre espèces animales jusqu'à des doses très élevées, ne montraient pas de lésions ou de tableau de nature à prédire une toxicité neurologique particulière,
- le caractère très inhabituel de la présentation clinique et radiologique de l'atteinte cérébrale observée chez plusieurs volontaires de la cohorte MAD n°5, ne s'apparentant à rien de connu à ce jour,
- le fait qu'aucun signe patent, neurologique ou radiologique, de ce type n'ait été retrouvé chez les autres volontaires (certains ayant absorbé jusqu'à 100 mg en dose unique ou 200 mg en dose cumulée sur 10 jours),
- enfin, le fait que cet accident soit survenu avec une molécule apparentée à d'autres composés (une dizaine) dont plusieurs ont vu leur développement abandonné du fait d'une efficacité insuffisante sans qu'aucune toxicité neurologique ou autre n'ait été observée.

Sur le plan de la logique formelle, une toxicité n'étant survenue que dans l'une des 14 cohortes de volontaires ayant reçu le BIA-2474, ne pourrait s'expliquer que par :

- une erreur d'administration ou de procédure touchant spécifiquement cette cohorte,
- une particularité commune aux six sujets ayant présenté des signes de toxicité,
- un effet lié à la dose cumulée de BIA 10-2474 que ces sujets ont reçue.

L'exploration de la première hypothèse n'entraîne pas dans les missions du CSST mais cette hypothèse semble très peu probable. Les procédures de contrôle de la dose administrée sont très strictes dans les études de Phase 1. De plus, le produit contenu dans les gélules administrées à tous les groupes de volontaires était le même que celui utilisé pour les études de toxicologie et a, secondairement, été testé comme étant de grande pureté.

Le CCST s'est donc essentiellement centré sur les deux autres hypothèses.

12.1. Hypothèse d'une particularité commune aux volontaires de la cinquième cohorte MAD

Plusieurs possibilités ont été discutées :

12.1.1. Hypothèse d'une contamination infectieuse

La proximité de vie des volontaires d'une même cohorte et la consommation pluriquotidienne des mêmes aliments pourrait accréditer cette hypothèse, d'autant plus que certaines infections, possibles dans ce contexte, peuvent avoir une expression neurologique centrale. Par exemple, il existe une forme rhombencéphalitique de listériose avec une localisation des lésions pouvant évoquer celle observée à Rennes. Cette hypothèse est cependant très peu plausible. D'abord, cette forme clinique est rare chez l'homme (la forme neurologique la plus fréquente de la listériose étant une méningo-encéphalite). Il aurait ensuite fallu qu'elle ne touche que les volontaires exposés au *verum*. Ces deux conditions réalisaient un scénario hautement improbable au plan statistique. Enfin et surtout, l'analyse des symptômes présentés par les volontaires et celle des images observées à l'IRM ne cadrent pas avec cette hypothèse.

12.1.2. Hypothèse d'une interaction avec d'autres produits

Evoquée à plusieurs reprises dans les jours ayant suivi l'annonce de l'accident de Rennes, une telle interaction aurait pu impliquer des médicaments, des aliments (comme le chocolat) ou des substances « récréatives » (alcool, stupéfiants dont le cannabis, etc.). L'hypothèse « médicaments » paraît résolument improbable au vu des bonnes pratiques de Phase 1 ; surtout, il faudrait admettre la prise d'un ou plusieurs médicament(s) commun(s) par les six sujets hospitalisés alors que ceux-ci étaient d'âges (27 à 49 ans) et de profils très différents.

Une interaction, de type pharmacodynamique ou pharmacocinétique, du BIA 10-2474 ou de l'un de ses métabolites avec un aliment paraît également peu plausible. Une analyse de la littérature n'a pas permis de retrouver d'exemple de toxicité neurologique centrale, de symptomatologie pouvant évoquer celle observée à Rennes, attribuée à une interaction médicament/aliment, quelle qu'en soit le type. Il en va de même pour une consommation de chocolats par ces volontaires (l'accident étant survenu dans les deux semaines suivant les fêtes de Noël). Le chocolat ne contient que de très faibles quantités d'anandamide. De plus, l'hyperstimulation du système endocannabinoïde n'est pas connue comme pouvant générer un tableau du type de celui observé à Rennes (voir plus loin).

Une modification du métabolisme du BIA par un aliment ou une boisson (agissant, par exemple, comme inhibiteur ou inducteur de la voie des cytochromes P450) ne peut être, en l'état, exclue mais semble peu plausible.

A ce jour, rien n'accrédite l'hypothèse d'une consommation de stupéfiants par les volontaires, immédiatement avant ou pendant leur séjour au Centre Biotrial. Les résultats des inspections et enquêtes en cours seront pertinents de ce point de vue pour infirmer ou conforter une telle hypothèse. Cependant, en dehors de l'entorse grave aux bonnes pratiques de Phase 1 (sur le plan de la surveillance des volontaires notamment) qu'une telle consommation, *a priori* collective, constituerait (il faudrait, en effet, la considérer commune aux volontaires hospitalisés de la cohorte MAD n°5 et, de plus, inexistante pour les sujets des paliers de dose inférieurs), cette hypothèse se heurte au même argument que précédemment. Il semble, en effet, acquis au plan neuroscientifique, qu'une stimulation, directe ou indirecte, même massive, des récepteurs endocannabinoïdes, en particulier les CB1, ne saurait induire une toxicité du type de celle observée à Rennes. Même s'ils peuvent chez certains sujets induire des effets graves au plan psychiatrique (par exemple, un épisode psychotique), ni le cannabis, ni sa principale substance active, le tétrahydrocannabinol, n'induisent, même expérimentalement et à forte dose, d'atteinte lésionnelle cérébrale toxique aiguë. En clair, une telle consommation pourrait agir, au mieux, comme cofacteur mais certainement pas comme élément déclenchant et, encore moins, constituer la cause de l'accident survenu.

12.1.3. Hypothèse d'une particularité génétique, de métabolisme ou de réponse pharmacologique commune aux sujets de la cinquième cohorte MAD

Il existe de nombreux facteurs, entre autres génétiques, susceptibles de moduler la susceptibilité individuelle à l'administration d'un inhibiteur de la FAAH. Par exemple, cette enzyme existe, nous l'avons vu sous deux isoformes (FAAH-1 et FAAH-2) d'activité différentes. De même, on retrouve à plusieurs niveaux le système des cytochromes P450 dont l'activité peut grandement varier d'un individu à l'autre. Pour séduisante qu'elle soit, cette hypothèse se heurte aux lois de la statistique. Pour l'exemple de la FAAH, si l'on considère que la prévalence des porteurs des deux isoformes est de 38% en

population générale, la probabilité d'en retrouver 5 chez les 6 sujets exposés de la cohorte était de 3 chances sur 100 et de 3 chances sur 1000 de la retrouver chez les six sujets exposés. Si l'on refait le calcul, ce qui serait plus pertinent, non pas avec 38% mais avec 5% (prévalence des porteurs de la seule isoforme à faible activité), les résultats excluent alors totalement une telle possibilité. Il en va de même pour la probabilité d'avoir inclus, par hasard, une majorité de sujets métaboliseurs rapides dans une cohorte antérieure ce qui aurait pu fausser les prédictions pharmacocinétiques pour le calcul de la dose à administrer aux volontaires de la cohorte MAD n°5.

Il s'impose donc que la symptomatologie présentée par les volontaires de la cohorte n°5 ne peut qu'être liée qu'à la dose de BIA 10-2474 qui leur a été administrée de manière quotidienne et répétée.

12.2. Hypothèses autour d'un effet seuil lié à la dose cumulée de BIA 10-2474

Si ce second groupe d'hypothèses apparaît beaucoup plus probable, les mécanismes envisageables sont particulièrement nombreux, certains restant purement hypothétiques. Ils peuvent faire intervenir la molécule elle-même et/ou un médiateur comme l'anandamide.

Rappelons tout d'abord le caractère très inhabituel de cette toxicité dose-dépendante, *a priori* sans signes avant-coureurs rapportés chez les volontaires ayant été exposés à des doses inférieures. Tout se passe « *comme si quelque chose lâchait ou basculait subitement à un seuil précis de dose ou de concentration* ». Une telle expression peut être compatible avec le fait que le BIA 10-2474 est caractérisé par une courbe dose-effet très raide (on passe, dans une plage de concentrations assez étroite, d'une absence d'inhibition de la FAAH à une inhibition totale et très prolongée) et par le fait que la pharmacocinétique du BIA devient non-proportionnelle chez l'homme à partir d'une dose située entre 40 et 100 mg.

Rappelons également que le BIA a les caractéristiques d'une molécule pouvant se fixer sur (et, donc, potentiellement inhiber) des hydrolases cérébrales autres que celle constituant sa cible pharmacologique. La spécificité du BIA 10-2474 pour la FAAH est nettement plus faible que celle d'autres inhibiteurs antérieurement développés. Elle a, de plus, été administrée aux volontaires de la cohorte MAD n°5 à des doses environ 10 fois plus fortes que celle semblant inhiber, complètement et de manière très prolongée, la FAAH chez l'homme.

Il est donc très probable, pour ne pas dire quasi-certain que le mécanisme de l'accident survenu à Rennes soit à rechercher en dehors du système endocannabinoïde, d'autant plus que la stimulation des récepteurs endocannabinoïdes par l'anandamide ne peut *a priori* induire une toxicité de ce type.

Plusieurs mécanismes peuvent être évoqués:

12.2.1. Inhibition d'autres hydrolases cérébrales par le BIA 10-2474

Cette piste et la suivante (voir 12.2.2) sont, de par leur plausibilité biologique, celles à privilégier en première analyse. Rappelons que le BIA 10-2474 a été administré chez les volontaires de la cohorte MAD n°5 à une dose (50 mg) probablement plus de 10 fois plus forte que celle inhibant complètement l'activité de la FAAH. Augmenter les concentrations tissulaires au-delà de celles inhibant déjà complètement l'enzyme ne peut, en aucun cas, majorer l'effet pharmacologique mais a toutes chances de favoriser

(surtout avec un produit aussi peu spécifique) une fixation sur d'autres hydrolases à sérine. Ceci pourrait, par un mécanisme direct ou indirect (inconnu à ce jour), être à l'origine des atteintes cérébrales observées à Rennes.

Il est intéressant de rappeler que ces atteintes n'ont *a priori* été observées ni chez l'animal malgré l'utilisation de doses très fortes, ni chez les six volontaires ayant reçu 100 mg de BIA en administration unique. Elles sont survenues à partir du cinquième jour d'une administration quotidienne de 50 mg. Ce constat n'est nullement incompatible avec l'hypothèse :

- le mécanisme en cause pourrait être affecté, comme cela est assez courant en toxicologie et pharmacovigilance (toxicité cumulative, par exemple), d'une latence d'expression,
- les particularités pharmacocinétiques de la molécule (pharmacocinétique non proportionnelle, grand volume de distribution), détaillées plus haut, rendent plausible une accumulation progressive de la molécule au niveau des tissus cérébraux. Les concentrations auraient pu y atteindre un seuil déclencheur au cinquième ou sixième jour d'administration.

La différence de susceptibilité animal/homme semble plus difficile à expliquer. De telles particularités, dans un sens ou dans l'autre, ont, cependant, déjà été observées. Il n'est pas non plus sans intérêt de remarquer que s'agissant de l'inhibition de la FAAH, les doses nécessaires étaient environ 10 fois plus faibles chez l'homme que ce que permettait d'attendre les études menées chez l'animal.

12.2.2. Toxicité du BIA 10-2474 par un autre mécanisme

Le point de départ serait, comme dans le scénario précédent, un « trop plein » de forme libre de BIA 10-2474 dans les tissus cérébraux lié (1) à une dose administrée trop forte vis-à-vis du blocage de la FAAH endocannabinoïde, et, sans doute, (2) aux caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule (cinétique devenant non-proportionnelle, possible accumulation tissulaire en cas d'administration répétée, etc.). La différence est ici que le mécanisme pathogénique ne passerait pas par l'inhibition d'autres hydrolases à sérine mais par une toxicité *in situ* de la molécule vis-à-vis de structures cellulaires impliquées, par exemple, dans les échanges au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Une hypothèse crédible ciblerait le groupe « partant » imidazole-pyridine du BIA 10-2474 qui pourrait soit se fixer sur des protéines cérébrales, soit inhiber le système des cytochromes P450-époxydes en entraînant un vasospasme. En effet, dans le cas du BIA 10-2474, et contrairement à d'autres inhibiteurs de la FAAH, le noyau imidazole est situé en position adjacente au carbone électrophile, siège de la liaison avec la FAAH. Comme précédemment, cette hypothèse se heurte au fait qu'aucune toxicité de ce type n'a été observée chez l'animal malgré l'administration de fortes doses ; les réponses apportées à cette objection peuvent être les mêmes que ci-dessus.

12.2.3. Toxicité d'un métabolite du BIA 10-2474

La toxicité de l'un des quatre métabolites identifiés en périphérie (plasma) chez l'homme et l'animal pourrait également être envisagée. Leur toxicité spécifique n'a pas été testée par Bial mais ces métabolites sont produits en très faibles quantités (<3% de la concentration circulante en BIA 10-2474) même si la variabilité pharmacocinétique semble plus élevée chez l'homme que chez l'animal. L'ensemble des métabolites identifiés du BIA conservent une structure proche de la molécule mère et rien, dans le

dossier, n'apparaît en faveur d'une toxicité particulière de l'un d'entre eux. Il est, de plus, possible (comme c'est fréquemment le cas lors des processus de métabolisation) que ces dérivés soient de nature plus hydrophile que le produit parent. Ceci tendrait à rendre le franchissement de la barrière hémato-encéphalique plus difficile à moins d'envisager l'existence d'un transporteur spécifique et/ou l'inhibition d'une pompe d'efflux lors de la montée des concentrations circulantes en prise répétées. Cette affirmation est cependant à pondérer par le fait que Bial a indiqué avoir envisagé de développer plusieurs de ces métabolites comme inhibiteurs de la FAAH ce qui laisse supposer *a priori* un franchissement non négligeable de la barrière hémato-encéphalique.

Reste à envisager l'hypothèse, purement théorique, d'un métabolite à fort tropisme tissulaire et non quantifié chez l'homme du fait d'un ratio tissus/plasma très élevé et des très faibles concentrations plasmatiques qui en résultent.

Enfin, l'effet d'un polymorphisme génétique, faisant par exemple produire un métabolite en plus grande quantité chez certains individus, semble à exclure pour des raisons statistiques (il faudrait que cette particularité, si elle existe, ait affecté l'ensemble des volontaires atteints de la cohorte MAD n°5).

12.2.4. Possibilité d'effets toxiques liés à l'anandamide

Le blocage de l'activité de la FAAH aboutit, nous l'avons vu, à l'augmentation des concentrations intracérébrales d'anandamide ce qui permet d'envisager plusieurs possibilités :

- *Fixation de l'anandamide sur d'autres récepteurs*

L'anandamide est un médiateur dont l'ubiquité dépasse largement le système endocannabinoïde. Elle est capable, d'autant plus que ses concentrations augmentent, d'interagir avec plusieurs types de récepteurs (au moins les TRPV1, PPAR et NMDA) et avec la voie de la MAP-kinase avec des conséquences possibles en termes d'apoptose et de neuroprotection.

- *Toxicité de produits de dégradation de l'anandamide*

En cas d'inhibition complète et prolongée de la FAAH, l'anandamide peut être dégradé par la voie des cyclo-oxygénases ce qui donne naissance à divers composés (leucotriènes et prostanoïdes) dont certains ont des effets connus sur la vasomotricité cérébrale pouvant être compatibles avec certaines des lésions observées chez les volontaires de la cohorte MAD n°5.

La plausibilité de ces deux hypothèses est cependant fortement questionnée par une série d'arguments contraires:

- L'administration, y compris à forte dose, d'anandamide ou de ses analogues non-métabolisables (ex : méthanandamide) à des animaux n'est pas connue pour entraîner une toxicité neurologique, du moins du type de celle examinée par le présent rapport.
- Cette toxicité n'a pas été observée (ni chez l'homme, ni chez l'animal) avec d'autres inhibiteurs, *a fortiori* plus spécifiques, de la FAAH, y compris avec ceux décrits comme irréversibles, ceci même lors d'administrations à des doses fortes et répétées.
- Une inhibition, complète et durable, de la FAAH, et donc *a priori*, le plateau des concentrations intracérébrales d'anandamide, semblent obtenus chez l'homme dès des doses de BIA 10-2474 de l'ordre de 5 mg alors qu'aucune toxicité

neurologique n'a été observée chez les volontaires ayant reçu, en administrations répétées (10 jours), jusqu'à quatre fois cette dose (20 mg).

13. Conclusions du CSST

L'accident survenu chez plusieurs volontaires de l'essai mené par Biotrial apparaît clairement lié à la molécule testée.

Il est très peu probable que cette toxicité soit liée à la stimulation du système endocannabinoïde *via* l'inhibition de la FAAH (cible pharmacologique du BIA 10-2474). Un mécanisme toxique lié à l'augmentation des concentrations intracérébrales d'anandamide paraît également *a priori* à exclure.

Dans l'état actuel des connaissances, la responsabilité de l'un des métabolites identifiés du BIA 10-2474 ne paraît pas non plus à privilégier. Notons cependant que le décalage d'apparition des effets toxiques observés dans la cohorte MAD n°5 pourrait être compatible avec la production d'un métabolite qui, du fait d'une demi-vie d'élimination plus longue que celle du composé parent, pourrait s'accumuler dans le compartiment tissulaire au fur et à mesure des administrations jusqu'à ce que sa concentration y atteigne un seuil déclenchant.

Nonobstant, l'hypothèse à ce jour la plus vraisemblable est celle d'une toxicité propre de la molécule *via* sa fixation sur d'autres structures cellulaires cérébrales facilitée par :

- sa faible spécificité pour son enzyme cible,
- l'utilisation de doses répétées bien supérieures à celles entraînant (au moins chez l'homme) une inhibition complète et prolongée de la FAAH, et
- sa probable accumulation progressive, au niveau cérébral, sans doute liée aux particularités pharmacocinétiques du BIA 10-2474. Ceci serait de nature, à expliquer pourquoi l'accident de Rennes n'est survenu qu'à partir du cinquième jour d'administration d'une dose de 50 mg et non chez les volontaires ayant reçu une dose deux fois plus forte en administration unique.

Il est, à ce stade, difficile de privilégier un mécanisme de toxicité parmi les deux semblant les plus probables: inhibition d'autres hydrolases à sérine, ou action délétère du groupement « partant » imidazole-pyridine.

Le fait que cette toxicité n'ait pas été observée chez l'animal malgré l'administration de doses très élevées reste, à ce jour, inexplicé. On doit cependant noter que, vis-à-vis de l'inhibition de la FAAH, le BIA 10-2474 se révèle environ 10 fois plus actif chez l'homme que chez l'animal.

L'apparition brutale de la symptomatologie toxique pourrait être en rapport avec le caractère que l'on peut juger *a posteriori* « peu maniable » de la molécule de BIA 10-2474 caractérisée par une relative faible efficacité (concentrations inhibitrices de l'ordre du micromolaire), une faible spécificité et une courbe concentration-effet particulièrement raide. Dans ces conditions, l'accélération peu compréhensible de l'escalade des doses entre les cohortes MAD 20 et 50 mg a vraisemblablement joué un rôle important dans le déclenchement de l'accident. Dans cette optique, une telle augmentation des doses était d'autant plus risquée que, du fait de la chronologie d'enchaînement des cohortes et des délais nécessaires aux analyses, les dernières données pharmacocinétiques disponibles étaient celles des sujets de la cohorte 10 mg.

Une telle séquence interdisait pratiquement d'adapter la dose à administrer à la vue d'une non-proportionnalité naissante. Ceci aurait été encore plus problématique pour la dernière dose prévue initialement, soit 100 mg (dose pour laquelle la pharmacocinétique est probablement clairement non-proportionnelle) puisque l'éventuel ajustement de sécurité se serait fondé sur les données de la cohorte 20 mg.

Il n'entrait pas dans les prérogatives du CSST (contrairement aux deux inspections en cours) de se prononcer sur le bien-fondé de l'autorisation de l'essai par l'ANSM après avis du Comité de Protection des Personnes de Brest. Au plan scientifique, le CSST considère cependant que :

- Le BIA 10-2474 ne pouvait pas, *a priori*, être considéré comme un produit à risque selon les critères listés dans les recommandations en vigueur, en particulier le *Guideline on strategies to identify and mitigate risks in first in human clinical trials with investigational medicinal products (Committee for Medicinal Products for Human use, CHMP, EMA, 2007)*.
- Les données transmises, notamment la Brochure Investigateur ne contenaient pas d'informations, notamment au plan toxicologique, de nature à faire craindre un risque particulier lors d'une première administration à l'homme. Rappelons cependant que cette brochure comporte un assez grand nombre d'erreurs, d'imprécisions, d'inversion de chiffres ou de traduction erronée des documents sources qui rendent la compréhension difficile sur plusieurs points. Ceci est tout à fait surprenant du fait de l'importance réglementaire de ce document.

14. Recommandations du CSST pour la conduite d'essais de première administration de médicament à l'homme

La gravité de l'accident survenu à Rennes justifie que la réglementation et les bonnes pratiques internationales concernant les études de première administration à l'homme évoluent sur plusieurs points. En effet, si le dossier du BIA 10-2474 et le protocole de l'essai mené par Biotrial respectent les dispositions et les recommandations en vigueur c'est plus dans la règle que dans l'esprit. Répondre aux exigences réglementaires ne doit faire oublier ni les bases de la pharmacologie et de la clinique, ni la finalité thérapeutique du développement d'un médicament. Cette prééminence de la règle sur le bon sens et la logique scientifique traduit une évolution potentiellement dangereuse et appelle à une prise de conscience collective. L'accident survenu à Rennes l'illustre de manière dramatique.

Le CSST formule donc six recommandations qu'il souhaite voir porter devant les instances réglementaires européennes et internationales ainsi qu'auprès des associations et organismes concernés.

- 1. Tout d'abord, un médicament est développé avec l'objectif final d'une utilité aux plan thérapeutique et de santé publique. De ce fait, la justification et la démonstration d'une activité pharmacologique prédictive d'une efficacité chez l'homme ne peuvent être considérées comme secondaires. Dans le cas du BIA par exemple, sur les 63 pages de la Brochure Investigateur qui résumant les données précliniques, moins de deux sont consacrées à la démonstration d'une activité pharmacologique pour l'indication *a priori* envisagée. Les tests pratiqués n'ont,

de plus, pas permis de déterminer une dose efficace avant d'entreprendre un développement préclinique et clinique long, coûteux et jamais sans risque. Ces tests permettent de considérer le BIA 10-2474 comme un produit d'efficacité potentielle, au mieux, modeste dans l'indication pressentie, en tout cas clairement inférieure à celle du produit de comparaison (donnée supprimée de la Brochure Investigateur).

Un prérequis, indispensable à tout développement clinique, serait que des études suffisamment complètes de pharmacologie préclinique, comparatives chaque fois que possible, soient menées précocement, en utilisant une gamme de doses suffisamment large (pour établir, quand cela est pertinent, une courbe dose-effet) et de manière à être prédictives de la réalité d'une future efficacité thérapeutique. Cette justification préalable devrait être clairement mise en exergue par le promoteur et prioritairement étudiée lors des avis préalables (comités de protection ou d'éthique) et des demandes d'autorisation.

- 2. Pour les médicaments à tropisme « système nerveux central », le bilan pratiqué pour la sélection, l'inclusion et le suivi clinique des volontaires dans une étude de Phase 1 devrait impérativement comprendre une évaluation neuropsychologique avec entretien clinique et tests cognitifs. Ceci (non prévu dans le protocole de Rennes) serait de nature à identifier des sujets potentiellement à risque et à repérer précocement la survenue de modifications comportementales ou de troubles neuropsychologiques lors de l'exposition au produit à l'étude.
- 3. Tout protocole de première administration à l'homme et de Phase 1 devrait, sauf si cela était sans objet, prévoir que les doses à évaluer chez les volontaires puissent être réajustées en fonction des données recueillies chez des volontaires ayant déjà été exposés au cours de l'essai. Ceci concerne évidemment (comme cela est habituellement prévu, notamment par le protocole de Rennes) l'ajustement de la dose en fonction des paramètres pharmacocinétiques du palier de dose précédent (en fait, du palier n-2 dans le cas de Rennes). Ceci devrait également concerner les données de pharmacodynamie. Dans le cas du BIA 10-2474, s'il se confirmait que la concentration inhibitrice de la FAAH était 10 fois plus faible chez l'homme que chez l'animal, le choix d'une dose maximale à tester de 100 mg (20 fois la dose entraînant une inhibition complète) ne se justifiait plus et pouvait être de nature à faire courir un risque. Concernant l'ajustement de la dose en fonction des paramètres pharmacocinétiques mesurés, la variabilité et ses extrêmes, et non uniquement la moyenne de ces paramètres, devraient être pris en compte dans les calculs, ceci dans une optique de précaution de type « scénario du pire ».
- 4. Lors des essais de première administration à l'homme et de Phase 1, la recherche d'une sécurité maximale pour les volontaires devrait s'imposer avant toute considération d'ordre pratique, économique ou réglementaire. A ce titre, il est important qu'un travail pluridisciplinaire s'engage au niveau international pour redéfinir les options méthodologiques permettant de concilier une durée d'étude restant acceptable et un niveau de sécurité optimisé. Par exemple, à l'instar de ce qui se pratique lors des études en dose unique, la séquence d'administration des doses pourrait être décalée en MAD de manière à ne pas exposer tous les sujets d'une cohorte au même instant. De même, la chronologie

d'enchaînement des différentes cohortes devrait permettre de disposer des paramètres pharmacocinétiques des sujets du palier de dose immédiatement précédent (n-1) ; un décalage plus important peut se révéler problématique en cas de non proportionnalité de la pharmacocinétique avec la dose administrée.

- 5. Les stratégies d'escalade de doses en première administration à l'homme et Phase 1 devraient faire intervenir des considérations fondées sur le bon sens clinique et pharmacologique. Par exemple, dans le texte de l'Agence Européenne cité plus haut, on lit simplement à ce sujet: « *Dose increase should proceed with caution taking into account identified risk factors from non-clinical studies* ». Nous l'avons vu, le facteur déclenchant de l'accident survenu à Rennes pourrait être le choix d'une dose à tester trop forte en fonction des nouvelles données recueillies chez l'homme ainsi qu'une progression de dose devenant plus rapide dans la zone potentiellement à risque. Dans cette optique, une progression géométrique (surtout de raison 2 ou plus) maintenue jusqu'au terme de l'escalade ne paraît pas raisonnable. Le CSST recommande donc que les progressions de type géométrique soient, dans la mesure du possible, évitées ou, du moins, que leur raison soit réduite en fin de progression.

- 6. Enfin, le CSST souhaiterait que nonobstant les nécessaires considérations pour la propriété industrielle, un débat, au niveau européen et international, s'ouvre au sujet de l'accès aux données des essais de première administration à l'homme et de Phase 1, en cours ou ayant été antérieurement menés. Ceci constituerait indiscutablement un progrès en matière de protection des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. Par exemple, la comparaison avec les protocoles d'étude de produits antérieurement développés ou l'accès facilité aux données de toxicologie et de tolérance clinique permettrait une analyse comparative très utile, notamment lors de l'analyse d'un protocole en vue d'un avis sur son autorisation.

Version approuvée par les membres du CSST avant transmission au Directeur Général de l'ANSM (Monsieur Dominique Martin) le lundi 18 avril 2016.