

Place de l'Anatomie Pathologique dans les études de toxicologie préclinique



Pierre Liberge
Senior Pathologist
Drug safety Assessment
MDS Pharma Services

Académie Vétérinaire
8 Novembre 2008

Anatomie Pathologique ou Pathologie ?

On utilise plutôt le terme de Pathologie, en référence à la traduction anglo-saxonne

Dorland's Illustrated Medical Dictionary, le terme « anatomie pathologique » n'existe pas. Il est remplacé par le terme de Pathology :

« Pathology : that branch of medicine which treats of the *essential nature of disease*, especially of the **structural** and *functional changes* in tissues and organs of the body, which cause or are caused by disease.

De même on utilisera plutôt le terme de Pathologiste que celui d'anatomo-pathologiste

Les principaux domaines couverts par la pathologie au cours des essais de toxicologie préclinique :

-L'autopsie et la pesée des organes

(-La technique)

-La Lecture histopathologique

L'Autopsie : Généralités

- Moment clé dans le déroulement de l'étude qui assure la transition entre les deux phases principales de l'étude: la phase in vivo et la phase post mortem
- Moment ponctuel, relativement bref au cours duquel on recueille des informations qui seront exploitées ultérieurement (prélèvements, description etc..)
- On ne peut revenir dessus. Les informations (prélèvements, descriptions etc..) perdues ou omises lors de l'autopsie le sont de manière définitive et peuvent entraver de façon plus ou moins grave les résultats de l'étude.
- Travail qui revêt une certaine pénibilité (station debout pour l'autopsie des grands animaux, odeurs..)



Grande concentration

Les différentes étapes de l'autopsie

➤ Sacrifice des animaux:

Respect des règles d'éthique animale
Présence d'artéfacts liés à l'euthanasie

➤ **Pesée des organes principaux** (foie, cœur, reins, rate, cerveau, thymus, thyroïdes, hypophyse, organes génitaux..), mais au cours de certaines études d'autres pesées peuvent être demandées: ex: pancréas, nœuds lymphatiques, fémur etc..)

➤ **Prélèvements des organes avec fixation** (en général formol tamponné à 10%; avec éventuellement utilisation de fixateurs spécifiques pour certains organes)

➤ **Description des anomalies observées** en prenant en considération que la macroscopie doit rester uniquement qualitative: modifications de forme, taille, consistance, couleur (ex: sang = liquide rouge)

Cas particulier du terme masse utilisé pour décrire toute excroissance d'un organe sans que cela ne sous-entende une connotation particulière. C'est l'histologie qui donne la réponse.

La Technique histologique

▪ En général, peu d'intervention du pathologiste à ce niveau à l'exception d'un rôle de conseil dans certains cas spécifiques:

-Prélèvements d'organes inhabituels

-Anomalie complexe impliquant plusieurs organes ou tissus

▪ La technique comprend les étapes habituelles que sont

-Préparation et recoupe des tissus

-Déshydratation

-Inclusion

-Coupe

-Coloration

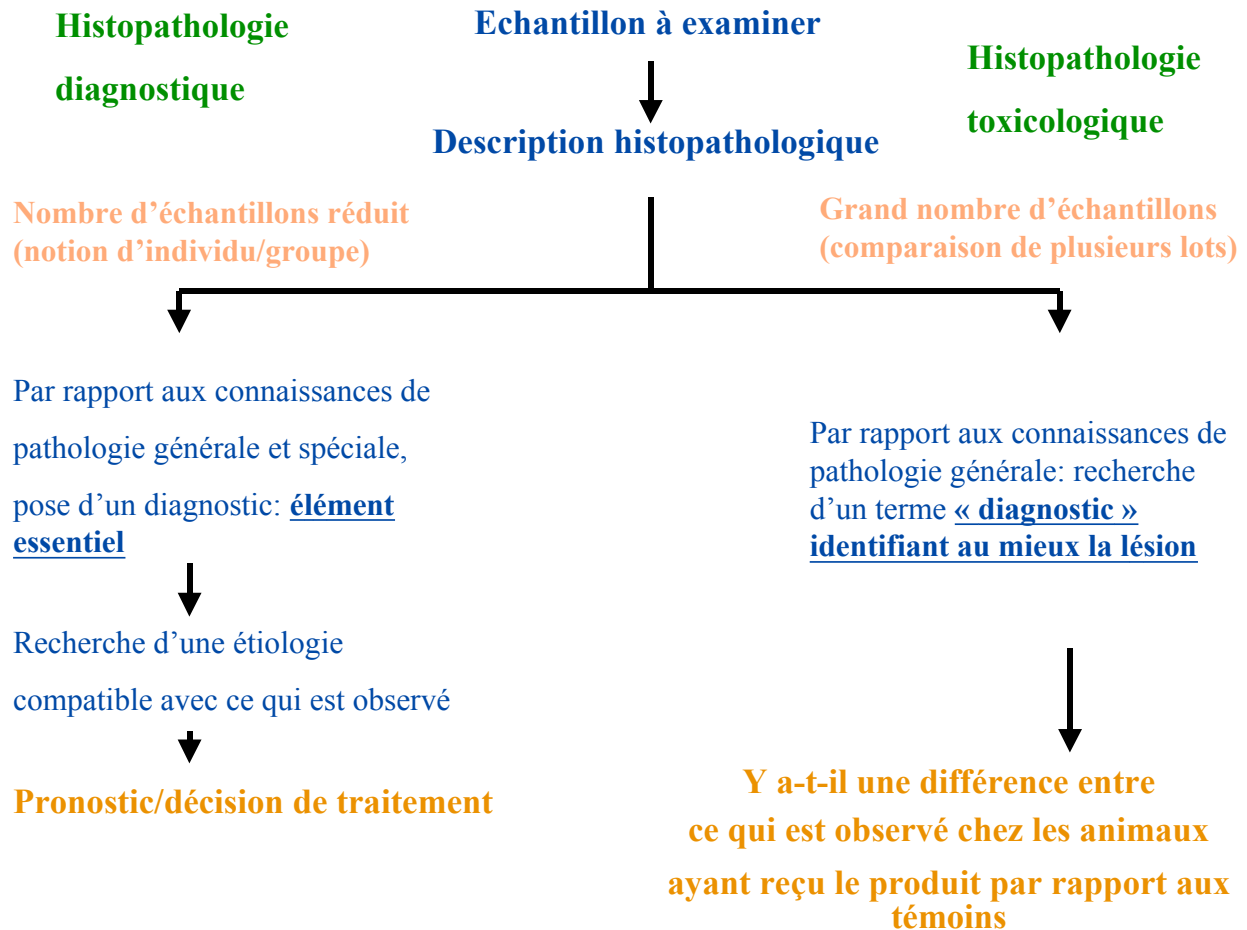
-Contrôle avant remise au pathologiste de l'étude

La lecture histopathologique des organes

Elément essentiel et prépondérant de la « pathologie »

Grand domaine d'activité du Pathologiste Toxicologue

Spécificités et contraintes
de l'environnement de
travail du Pathologiste
Toxicologue et leurs
conséquences



L'environnement BPL

➤ Le cadre BPL règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire:

Mode d'organisation couvrant l'ensemble des aspects organisationnels et opérationnels liés à la réalisation des essais de sécurité non cliniques sur les produits chimiques.

Ils ont pour but de garantir la qualité, la reproductibilité et l'intégrité des données générées à des fins réglementaires, afin que celles-ci puissent être reconnues

au niveau international sans qu'il soit nécessaire de reproduire les études. (Def. AFSSAPS)

➤ Nécessité pour le pathologiste d'avoir une qualification « reconnue »

➤ Importance de l'expérience acquise sur le terrain

➤ Les règles BPL:

-ont pour but d'assurer la qualité des études

-sont un cadre ou un moyen, et non pas un but, pour assurer la fiabilité de l'étude dans son déroulement

-permettent théoriquement de tout faire, à condition que cela soit justifié et documenté

Le nombre d'animaux, la lourdeur de la tâche et les conséquences

Le grand nombre d'animaux et donc de données générées est une caractéristique essentielle de l'environnement professionnel du pathologiste.

- étude 4 semaines rongeurs classique:
80 animaux, générant environ 4000 organes à prélever, à techniquer et à lire
- étude de cancérogénèse sur 500 animaux génère entre 25 000 et 30 000 organes à prélever, techniquer et lire

Conséquences

- Au niveau de l'autopsie: les personnes impliquées dans une séance doivent **toutes** avoir le **même seuil de prise en compte** d'une anomalie, **la nommer de la même manière**, et ce, **tout au long de la séance** (laquelle peut durer deux ou trois jours)
- au niveau de la lecture histopathologique, le pathologiste doit garder tout au long d'une étude une grande homogénéité dans:
 - la nomenclature des lésions**: appeler une lésion toujours de la même manière
 - le seuil de prise en compte** des anomalies
 - les critères de diagnostic et de gradation**

Le nombre d'animaux, la lourdeur de la tâche et leurs conséquences



Nécessité d'établir des critères de seuil et de s'y conformer:

- en suivant lorsque cela est possible les critères internationaux (international guidelines for diagnosis)
- Au niveau de la prise en compte de l'anomalie: ex: ne prend pas en compte un infiltrat lymphocytaire < 25 cellules environ (selon l'organe).
- Au niveau de la gradation : exemple : Néphropathie progressive du rat âgé (Chronic progressive nephropathy)
 - minimale si inclut < 20% du rein
 - légère si inclut entre 20 et 40% du rein
 - modéré si inclut entre 40 et 60% du rein
 - marqué si inclut entre 60 et 80% du rein
 - sévère si inclut > 80% du rein



Le nombre d'animaux, la lourdeur de la tâche et leurs conséquences

Autres méthodes d'examen parfois nécessaires notamment en fin d'étude

- Lecture horizontale pour homogénéiser les diagnostics et/ou les grades de sévérité (très fréquent)
- Réalisation d'une lecture en aveugle pour une anomalie spécifique afin d'éliminer le critère de subjectivité lié au fait de savoir que l'on se trouve en présence d'une lame provenant d'un animal traité ou non.
 - Non officielle par le pathologiste lui-même ou par un collègue et donc non documentée
 - De façon officielle:
 - une tierce personne masque les informations présentes sur les lames à l'aide d'un cache.
 - le pathologiste lit les lames et reporte sur une feuille (support papier ou directement en ligne) la présence ou non de l'anomalie
 - le masquage des lames est retiré et une corrélation est effectuée entre le diagnostic du pathologiste et les lames

Note: Un tel examen ne peut se faire que pour une anomalie déterminée

(ex: hypertrophie hépatocytaire) et déjà identifiée et non pas pour un animal entier

Cas particulier des tumeurs

➤ Pour les études de cancérogénèse qui utilisent entre 400 et 600 animaux, le but essentiel est de comparer les incidences des tumeurs parmi les groupes traités et témoins.



Importance de l'homogénéité dans le diagnostic des tumeurs tout au long de l'étude

➤ Outre le nombre des animaux, le diagnostic des tumeurs chez les rongeurs se heurte à plusieurs problèmes :

-une seule section est présentée au pathologiste (parfois deux pour les tumeurs volumineuses)

-on ne peut demander trop de recoupes (temps, coût, risque de biaiser les incidences)

-les critères morphologiques ne permettent pas toujours de déterminer le type de tumeur, en particulier de différencier une simple hyperplasie d'un adénome (tumeurs endocrines)

-les critères de malignité chez les rongeurs ne sont pas identiques à ceux rencontrés en humaine (pouvoir métastatique moindre)

Cas particulier des tumeurs: exemple de critères établis par la STP

➤ Il existe des standards édités par la Society of Toxicologic pathology (American STP) vers lesquels on doit tendre au maximum. Ils permettent entr'autres une certaine homogénéité entre pathologistes au niveau international:

➤ Malgré les critères STP, le pathologiste doit établir ses propres bases, en particulier pour tout ce qui est « limite »

Note: Pour les études de cancérogénèse, une revue par des pairs (« Peer-review ») est en général effectuée afin de s'assurer de l'homogénéité des diagnostics et de leur conformité avec les standards STP

Cas particulier des tumeurs: exemple de critères établis par la STP: tumeurs des cellules C de la thyroïde

C-CELL HYPERPLASIA

1. Focal or diffuse, unilateral or bilateral
2. Increased numbers of C-cells present in clusters less than five average follicular diameters or scattered in interfollicular space
3. Minimal compression or distortion of thyroid follicles
4. C-cells large and round to polyhedral with abundant pale eosinophilic cytoplasm and centrally located round nuclei
5. Diffuse lesions surround follicles resembling increased interfollicular tissue

C-CELL ADENOMA

1. Single or multiple, unilateral or bilateral
2. Discrete mass greater than five average follicular diameters
3. Noninvasive, rarely encapsulated, scant stroma, may contain scattered follicles, amyloid present rarely
4. Solid sheets of round to oval to fusiform cells with pale eosinophilic cytoplasm or, infrequently, basophilic cytoplasm, and round to oval centrally located nuclei

C-CELL CARCINOMA

1. Unilateral or bilateral
2. Solid sheets or irregular nests of cells separated by fibrovascular stroma, necrosis may be present, amyloid present rarely
3. Cells vary from round to polygonal with abundant pale eosinophilic cytoplasm and round to oval nuclei to markedly pleomorphic highly fusiform basophilic cells with high mitotic index
4. Penetration of thyroid gland capsule, local invasion of adjacent tissues and/or vessels, and metastasis indicate malignancy

La transmission de l'information: la rédaction du rapport de pathologie

➤ Le choix des mots:

- Macroscopie: Utilisation de termes descriptifs
- Microscopie: Utilisation de termes simples, descriptifs quitte à faire une description plus détaillée de la lésion dans le rapport.

Eviter au maximum l'utilisation de termes induisant une certaine ambiguïté avec d'autres termes utilisés en médecine humaine (ex: proscrire des termes comme infarctus, glomérulonéphrite et souvent les termes en « itis »).

➤ L'importance des photos

Dans certains cas, pour des lésions bien particulières, une illustration photographique est souvent la bienvenue (dans le cadre BPL bien évidemment, c'est à dire en documentant).

- Les documents relatifs à une étude étant archivés pour une durée plus ou moins longue (10 ans, voire même plus), il est toujours possible, plusieurs années après la lecture d'une étude de revenir sur les lames afin de
 - préciser la nature d'une lésion
 - effectuer des photographies
 - voir si des omissions n'ont pas été faites, etc..

La transmission de l'information

But: Il s'agit de traduire en mots les observations faites au cours des examens de pathologie.

Ce rapport, qui est un rapport d'expertise est écrit et signé par le pathologiste.

➤ Il comprend les différents points suivants:

- Un chapitre concernant les modifications éventuelles survenues au niveau des poids d'organes
- Un chapitre concernant les anomalies macroscopiques
- Un chapitre (en général le plus important) concernant la lecture histopathologique
- Un chapitre discussion où le pathologiste donne quelques informations concernant la pathogénie des lésions observées, (si cela est possible, en évitant toute spéculation)

➤ Pour chacun des chapitres, le pathologiste devra préciser:

- ce qui revient directement au produit
- ce qui est favorisé par le produit
- ce qui revient à la technique d'administration (injections IV, IM etc..)
- ce qui demeure douteux/incertain
- ce qui revient à une pathologie intercurrente ou est accidentel
- ce qui fait partie du bruit de fond de l'espèce considérée et par conséquent purement fortuit
- la dose à partir de laquelle aucun effet indésirable n'est observé en pathologie
- si possible les corrélations entre poids d'organes, macroscopie et histologie

Les diverses implications des pathologistes

➤ Implication très en amont dans le processus du développement d'un produit afin de déterminer très tôt les organes cibles.

Travail bibliographique important très tôt afin de savoir si des produits de la même famille sont connus pour entraîner tel ou tel type de lésions

➤ Travail sur le produit en phase de développement (lecture des études moyenne à long terme)

➤ Implication au niveau des dossiers pour effectuer des documents de synthèse avant soumission des dossiers aux autorités

Conclusion

- Le rapport de pathologie synthétisant l'ensemble de la pathologie d'une étude de toxicologie préclinique est un élément clé de l'étude en ce sens qu'elle doit identifier les « organes cibles » mais la pathologie doit être analysée à la lumière des autres données que sont la clinique et l'hémo biochimie.
- En ce sens, elle permet également la recherche de biomarqueurs spécifiques pour certains organes
- La pathologie ne peut à elle seule donner toutes les informations, et bien souvent, à défaut de dire ce qu'il y a elle ne permet que de dire ce qu'il n'y a pas

FIN

