

PLACE DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE DANS LES ÉTUDES D'ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ DES MÉDICAMENTS

TOXICOLOGICAL PATHOLOGY IN DRUG SAFETY ASSESSMENT

Par Pierre LIBERGE⁽¹⁾

(communication présentée le 8 novembre 2007)

RÉSUMÉ

Dans les études de toxicologie préclinique, le terme de « Pathologie » recouvre l'ensemble des examens anatomo-pathologiques (macroscopie et microscopie), effectués après le sacrifice des animaux. Ces examens se déroulent sous la responsabilité du « Pathologiste » qui travaille dans un environnement conforme aux « BPL » (Bonnes Pratiques de Laboratoire). Son travail consiste à comparer des lots d'animaux recevant un produit connu à différentes doses avec des animaux témoins, pour mettre en évidence d'éventuels effets indésirables liés à ce produit. Rigueur et homogénéité des seuils de description et de diagnostic entre les animaux sont essentielles pour ne pas introduire de dérive au cours du temps. Cette contrainte est l'une des grandes difficultés inhérentes au travail du pathologiste toxicologue. Enfin, le pathologiste rédige un rapport décrivant les effets du produit sur les poids d'organes ainsi que les éventuelles anomalies macroscopiques et microscopiques. Ce rapport est un élément clé du rapport toxicologique final, toutefois les résultats anatomo-pathologiques doivent être analysés à la lumière des autres données de l'étude, particulièrement celles issues de la clinique et de l'hématobiochimie.

Mots clés : anatomo-pathologie, toxicologie préclinique, évaluation de la sécurité du médicament

SUMMARY

In preclinical toxicology studies, pathology includes postmortem macroscopic and microscopic examinations of the tissues. These examinations are carried out under the responsibility of the pathologist in compliance with the principles of GLP (Good Laboratory Practice). The pathologist's duties involve comparing animals given a known drug at different doses with control animals to detect any adverse effects of the test compound. A disciplined, consistent approach is essential to ensure uniform reporting levels and avoid any drift in the diagnostic descriptions used between the animals during the course of the study. This is one of the most difficult constraints inherent to the work of the pathologist. At the end of a study, the pathologist writes a report describing any drug-related effects on organ weights as well as any macroscopic and microscopic abnormality. The pathology report is a key element in the final toxicological report. Nonetheless, pathology results should be evaluated in the light of the other study data, particularly those generated by the clinical examination, as well as hematology and biochemistry tests.

Keywords : pathology, preclinical toxicology, drug safety assessment

(1) MDS-Pharma-Services, Les Oncins, 69210 Saint-Germain sur L'Arbresle.

Dans l'immense majorité des cas, à l'issue de la période de traitement fixée par le plan d'étude, les animaux sont sacrifiés et les organes soumis à un examen macroscopique et histopathologique. Bien que le Directeur d'Étude soit le responsable de la conduite de l'étude, l'ensemble des examens *post mortem* s'exerce sous la responsabilité d'un anatomopathologiste ou « pathologiste » et correspond à ce qui est communément appelé la « Pathologie ».

En effet, il est de tradition, dans le domaine de l'évaluation de la sécurité du médicament, de préférer l'usage du terme « Pathologie » à celui d'Anatomopathologie. Il s'agit là d'une traduction littérale du mot anglo-saxon « Pathology », lequel prend en compte non seulement les modifications morphologiques liées à un processus pathologique, mais également les mécanismes de la pathogénie et les modifications fonctionnelles. « The pathology is that branch of the 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 »⁽²⁾ (Dorland's Illustrated Medical Dictionary).

LES DIFFÉRENTES ÉTAPES COUVERTES PAR LA PATHOLOGIE

Le sacrifice des animaux

A de rares exceptions près, l'euthanasie est précédée d'une diète hydrique, d'au moins seize heures, afin de supprimer le paramètre « consommation de nourriture », lequel peut influencer sur le poids de certains organes et également, en modifier l'aspect morphologique et fonctionnel (ex. foie, pancréas).

Bien que le pathologiste n'intervienne pas directement lors du sacrifice, il peut néanmoins être consulté car l'euthanasie d'un animal n'est pas un acte « banal » et nécessite le respect des critères d'éthique. Par ailleurs, chaque méthode de sacrifice entraîne peu ou prou des altérations histologiques, souvent mineures, qui sont des artefacts pouvant interférer avec de réelles lésions induites par le traitement.

L'autopsie et le prélèvement des organes

L'autopsie est un moment clé dans le déroulement d'une étude de toxicologie. Il s'agit là d'une étape ponctuelle dans le temps, mais qui régit l'ensemble des examens ultérieurs : tout organe perdu ou toute information manquée à ce moment l'est définitivement et irrémédiablement, ce qui peut avoir un impact sur le reste de l'étude. Ce travail, qui présente une pénibilité tant au niveau physique (station debout pour l'autopsie des

grands animaux, odeurs etc..) que psychologique, nécessite une grande concentration et ne doit pas laisser de place au hasard. Il est en général effectué par des techniciens supervisés par le pathologiste mais dans certaines structures, les autopsies se déroulent sous la responsabilité d'un technicien supérieur, le pathologiste n'intervenant qu'en cas de nécessité.

Prélèvement et fixation des organes

La liste des organes à prélever est régie par le plan d'étude. Cette étape se déroule suivant un ordre préalablement établi en évitant de générer des artefacts par l'utilisation de pinces ou autres instruments. L'opérateur doit effectuer ce travail dans un temps aussi court que possible, afin de limiter les phénomènes d'autolyse *post mortem*. Si nécessaire, on peut éviter la dessiccation des organes en attendant de prélèvement, par leur humidification régulière à l'aide de sérum physiologique à 0.9 %. Les organes sont mis dans une solution de fixateur. En routine, on utilise le formol tamponné à 10 %⁽³⁾, mais d'autres fixateurs sont possibles (ex. Davidson modifié pour les yeux et les testicules, éthanol à 95° pour l'immunohistochimie, solution de Karnovsky pour la microscopie électronique...).

La pesée des organes

Généralement, les principaux organes aisément isolables, dont la liste est régie par le plan d'étude, sont pesés : cerveau, hypophyse, foie, cœur, reins, rates, ovaires, testicules, épидидymes, vésicules séminales (si présentes), poumons, thymus, surrénales. Les cibles préférentielles de certains produits, comme le pancréas, les nœuds lymphatiques, les muscles, os, etc., peuvent être ajoutées à cette liste. La pesée s'effectue après un dégraissage aussi complet que possible des organes.

Examen macroscopique des organes

Au moment de leur prélèvement, les organes sont examinés et toute anomalie de couleur, de taille, de forme ou de consistance est notée. Les termes utilisés doivent être uniquement descriptifs, sans revêtir de caractère diagnostique.

La technique histopathologique

Elle comprend les différentes étapes qui, à partir du prélèvement effectué lors de l'autopsie, conduisent à la lame histologique destinée à être lue par le pathologiste. Au cours de cette phase, essentiellement technique, le pathologiste intervient peu, mais peut être néanmoins sollicité pour donner son avis sur le choix des sections dans le cas de prélèvements dits « non standards » ou bien lors de la présence d'anomalies inhabituelles prélevées lors de l'autopsie.

(2) « La pathologie est cette branche de la médecine qui traite de la nature essentielle de la maladie, en particulier des modifications structurelles et fonctionnelles au niveau des tissus et organes, qui causent ou sont causés par la maladie ».

(3) La législation prévoit dans un avenir proche de supprimer, pour des raisons de sécurité, l'utilisation du formol. Toutefois, à ce jour, aucun autre fixateur n'a été retenu.

La lecture histopathologique

C'est la partie la plus importante des examens de pathologie. La liste des tissus dont les sections sont à lire est aussi gérée par le plan d'étude et correspond généralement à celle des organes prélevés lors de l'autopsie.

LES SPÉCIFICITÉS ET LES CONTRAINTES INHÉRENTES AU TRAVAIL DU PATHOLOGISTE TOXICOLOGUE

Les interventions du pathologiste toxicologue ne sont pas fondamentalement différentes de celles du pathologiste qui exerce dans un but diagnostique. En revanche, la démarche intellectuelle, ainsi que le cadre de son travail et les contraintes environnementales, font que cette activité revêt un caractère spécifique d'où découlent un certain nombre de conséquences.

La démarche intellectuelle

Comme son nom l'indique, l'anatomie pathologique diagnostique vise à poser un diagnostic à partir d'une pièce macroscopique et/ou histologique, dans le but de pouvoir remonter à une étiologie connue, conduisant généralement à l'établissement d'un pronostic et à une stratégie de traitement. Il s'agit là d'examen impliquant un nombre limité d'individus ou d'organes, pour lesquels la précision du diagnostic est essentielle.

Dans le cas de la pathologie toxicologique, l'étiologie nous est d'emblée connue, puisqu'il s'agit du produit administré. Si son mode d'action pharmacologique est plus ou moins bien connu, en revanche, son éventuel mécanisme d'action pathologique est *a priori* inconnu, sans quoi les études n'auraient pas lieu d'être. Au final, le pathologiste toxicologue se doit de répondre à deux questions essentielles :

- y a-t-il une différence entre ce que l'on observe chez les animaux recevant le produit à différentes doses et chez les témoins n'en recevant pas⁽⁴⁾ ?
- cette différence a-t-elle un lien direct ou indirect avec l'administration du produit ?

Le terme de « diagnostic » est utilisé pour nommer la ou les anomalies observées, mais sa signification est toute relative car le but de l'étude est une comparaison entre plusieurs lots d'animaux et ce, sans connotation de pronostic ou de traitement.

Les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL)

Le pathologiste toxicologue travaille dans un environnement dit de « BPL ». Ces principes « constituent un mode d'organi-

sation 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 reconstruites au niveau international sans qu'il soit nécessaire de reproduire les études⁽⁵⁾ (Définition AFSSAPS) ».

Ce cadre impose, entre autres, d'étayer par une documentation appropriée tout fait ou intervention au cours d'une étude. Les BPL ne doivent pas être considérées comme un but à atteindre, mais sont un cadre dans lequel chacun doit travailler. Elles permettent de faire ce que l'on juge nécessaire, à condition de justifier son action : par exemple, le pathologiste peut, s'il le juge utile demander, au cours d'une autopsie, le prélèvement d'un organe présentant une anomalie non attendue, même si le plan d'étude spécifie que, pour cette étude en particulier, aucun organe ne sera prélevé. Toutefois, cet acte devra être documenté et signé et le devenir du prélèvement, précisé.

Le nombre d'animaux et les conséquences qui en découlent

Il s'agit d'une des spécificités inhérentes au travail du pathologiste toxicologue. Pour ne prendre que deux exemples, une étude classique de quatre semaines, effectuée chez le rat, utilise 80 animaux (40 mâles et 40 femelles) et génère environ 4000 organes ; une étude de cancérogénèse s'effectuant sur 500 animaux, en produit entre 25 000 et 30 000. Il s'en suit des conséquences tant au stade de l'autopsie qu'à celui de la lecture histopathologique.

A l'autopsie

Comme plusieurs personnes participent aux autopsies d'une étude donnée, lesquelles se déroulant généralement pendant deux ou plusieurs jours, il est essentiel que le seuil de prise en compte des anomalies et leur dénomination soient les mêmes pour chaque technicien, tout au long de la séance.

A la lecture histopathologique

La rigueur au cours de la lecture histopathologique est l'une des plus grandes difficultés auxquelles le pathologiste toxicologue se trouve confronté. Les critères de diagnostic, le seuil de prise en compte des anomalies, leur nomenclature ainsi que leur score de sévérité doivent être identiques entre le premier animal examiné et le dernier. Le pathologiste doit donc établir ses propres critères et s'y conformer. Par exemple, il peut décider que tout infiltrat lymphocytaire de moins de 25 cellules (environ) ne sera pas pris en compte ou bien alors, que l'érosion de l'endothélium

(4) Les animaux témoins reçoivent en général un véhicule connu ou bien parfois, un « placebo », nom donné au véhicule du produit testé.

(5) Définition AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé).

d'une veine sera évaluée comme minime si moins de 20 % de la surface sont atteints, comme légère, modérée ou marquée si respectivement de 20 à 40 %, de 40 à 60 % ou de 60 à 80 % de la surface sont atteints. Elle sera sévère si plus de 80 % de la surface sont érodés. Cette difficulté est telle, et les dérives si fréquentes, qu'elle implique la plupart du temps, de reprendre en fin de lecture d'une étude, quelques organes pour effectuer une lecture dite horizontale, afin de vérifier l'homogénéité des diagnostics et des gradations de sévérité. Dans les cas extrêmes, pour éviter un possible facteur subjectif lié au fait de savoir que l'organe examiné provient d'un animal traité ou non, une lecture dite « en aveugle » avec masquage de l'identité de la lame peut être effectuée. Un tel examen n'a cependant de sens que pour une anomalie déjà déterminée et identifiée auparavant, par exemple l'hypertrophie centrolobulaire au niveau du foie, et ne peut en aucun cas s'appliquer à la lecture d'une étude entière.

Lors des études de cancérogénèse, où la comparaison des incidences tumorales entre les différents lots est le but essentiel de l'étude, le pathologiste se trouve, en outre, confronté aux contraintes suivantes :

- le diagnostic ne s'effectue que sur une seule coupe histologique (deux pour les tumeurs volumineuses) et il n'est pas possible de demander un trop grand nombre de sections supplémentaires, lequel risquerait de biaiser les calculs statistiques s'il s'avérait être très supérieur dans un lot par rapport à un autre ;
- les critères morphologiques ne sont pas toujours suffisants pour établir un diagnostic, en particulier pour différencier une hyperplasie d'un adénome des tumeurs endocrines ;
- les critères de malignité des tumeurs chez les rongeurs ne sont pas les mêmes que ceux de la pathologie humaine, en particulier en ce qui concerne le pouvoir métastatique beaucoup plus réduit chez les rongeurs.

Pour ces raisons, un groupe de scientifiques internationalement reconnus ont édité des standards de diagnostic pour les lésions prolifératives et non prolifératives. Ceux-ci ont été agréés par la *Society of Toxicologic Pathology (American STP)* et sont remis à jour régulièrement. Ils permettent d'assurer, au niveau international, une homogénéité des critères utilisés par les pathologistes : ces critères peuvent être consultés dans le *Standardized system of nomenclature and diagnostic criteria, Guides for toxicological pathology* édités par la *Society of Toxicologic Pathologists*.

Toutefois, malgré ces lignes directrices, il existe toujours une « zone limite » où le pathologiste doit faire un choix et décider de son diagnostic.

Autre conséquence : le choix de la terminologie

La grande quantité de données générées nécessite l'utilisation de termes ciblés, éléments clés des tableaux d'incidence qui permettent, en fin d'étude, de mettre en exergue les anomalies spécifiques liées au produit et de les différencier de celles considérées comme faisant partie du bruit de fond de l'espèce considérée.

A l'autopsie

La liste des termes utilisés doit être connue de la part de l'ensemble du personnel et ne fait appel, comme nous le mentionnions précédemment, qu'à des critères morphologiques, par exemple les zones surélevées, les zones pâles etc. Ces termes, primaires, entrent dans les tableaux d'incidence et peuvent faire, le cas échéant, l'objet d'un qualificatif secondaire qui précise le lieu ou l'importance de l'anomalie. Par exemple, en ce qui concerne, pour l'estomac, les termes de « zones surélevées », de « multiples », de « partie glandulaire⁽⁶⁾ », la terminologie « zone surélevée » correspond au terme primaire, alors que les autres termes précisent l'importance et la localisation de l'anomalie et ne sont pas répertoriés dans des tableaux.

A la lecture histopathologique

La dénomination d'une lésion induite par un produit se fait préférentiellement en utilisant des termes descriptifs plutôt qu'une terminologie qui pourrait prêter à confusion avec une pathologie connue dans l'espèce considérée ou dans une autre espèce, espèce humaine comprise. Cela est d'autant plus vrai pour les lésions induites qui n'entrent pas dans le cadre d'une pathologie déjà connue. Le terme descriptif qui apparaît dans les tables d'incidence peut alors faire l'objet d'une description plus détaillée dans la partie narrative du rapport de pathologie.

Pour certaines études, comme celles de cancérogénèse, une revue par des pairs peut être effectuée afin de s'assurer de l'exactitude et de l'homogénéité des termes utilisés et également s'assurer qu'aucune anomalie majeure n'a été omise.

Toutefois, lors de la découverte d'anomalies particulièrement complexes, difficiles à décrire, puis à nommer, il est utile d'ajouter à cette description une ou deux photographies l'illustrant au mieux. Conformément aux règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire, ces clichés doivent être enregistrés dans un document, en précisant le numéro de l'étude, l'animal, le lot, l'organe et le grossissement. Près de l'organe photographié, doit être posé un régllet afin de pouvoir donner une idée de la taille de la lésion.

(6) Le glossaire des anomalies macroscopiques n'est pas absolu mais est propre à chaque société.

Il faut enfin garder à l'esprit que les documents relatifs à une étude étant archivés pour une durée de plusieurs années, il est toujours possible de revenir, longtemps après, sur les lames ou tissus d'une étude, afin de préciser la description ou la gravité d'une lésion, de faire des photographies, de vérifier d'éventuelles omissions...

LA RÉDACTION DU RAPPORT DE PATHOLOGIE

À l'issue de la lecture histopathologique, le pathologiste rédige un rapport d'expertise qui reprend les trois grandes parties précédemment décrites : variations du poids des organes, modifications macroscopiques et modifications microscopiques.

Pour chacun de ces points et particulièrement pour l'évaluation microscopique, le pathologiste doit faire ressortir les modifications liées à l'administration du produit, celles considérées comme étant favorisées par le produit, celles qui, le cas échéant, peuvent être liées à la procédure d'administration, celles qui sont accidentelles et enfin celles qui sont totalement indépendantes de cette administration et qui font partie du « bruit de fond » de l'espèce considérée. Il est important également de souligner, le cas échéant, les anomalies douteuses pour lesquelles aucune conclusion ferme ne peut être tirée à l'issue de l'étude. Lorsque cela est possible, on vérifie s'il existe une corrélation entre les modifications du poids des organes et/ou de l'aspect macroscopique avec celles observées à l'examen histopathologique (par exemple, augmentation de poids et de la taille de la thyroïde et hypertrophie des cellules folliculaires de la glande ; présence de zones rouges ou déprimées sur la muqueuse glandulaire de l'estomac et érosions ou ulcérations à l'examen histopathologique, etc.). Enfin, lorsque des animaux meurent en cours d'essai, le pathologiste doit indiquer la cause de la mort et préciser si celle-ci est liée ou non au produit.

À l'issue de la partie descriptive, le pathologiste donne, si cela est possible, quelques orientations concernant le mécanisme pathogénique des lésions observées, en évitant toute hypothèse purement spéculative.

Enfin, dans sa conclusion, il doit déterminer la dose considérée comme étant sans effet, c'est-à-dire n'ayant pas entraîné d'anomalies des organes examinés.

Lorsque des études comprennent des examens spécifiques, en microscopie électronique, en immunohistochimie ou faisant appel à des colorations spéciales, un paragraphe décrivant méthodes et résultats est inclus au rapport.

QUELQUES ASPECTS DU TRAVAIL DU PATHOLOGISTE TOXICOLOGUE

Si les activités du pathologiste toxicologue sont communes au sein de la profession, l'accent peut être mis sur une tâche plus spécifique dans une société donnée.

C'est ainsi que certains pathologistes sont impliqués très en amont dans le processus de développement des produits. Leur travail, pour une grande part de bibliographie, conforte leur connaissance des effets pharmacologiques et/ou toxicologiques de telle ou telle classe de produits et s'oriente essentiellement vers la pathogénie et la mécanistique. La recherche de biomarqueurs, signes spécifiques de l'altération débutante d'un organe, avant que n'apparaissent les lésions morphologiques, est également un point important de ce travail.

Pour d'autres pathologistes, en particulier ceux qui travaillent dans le domaine de la sous-traitance, l'accent est mis essentiellement sur la supervision des autopsies et la lecture de lames issues d'études réglementaires de moyen et long termes.

Enfin, dans certaines structures, le rôle du pathologiste peut être orienté vers un travail de dossier, dans le but de l'établissement de documents de synthèse regroupant les différentes études effectuées sur un même produit, en vue d'un dépôt auprès des autorités pour une Autorisation de Mise sur le Marché (Dossier AMM).

CONCLUSION

Comme nous venons de le voir, l'anatomie pathologique toxicologique ou « pathologie » recouvre l'ensemble des examens effectués après le sacrifice des animaux d'une étude. Leurs résultats, comportant les variations du poids des organes ainsi que les modifications observées à l'examen macroscopique et microscopique, font l'objet d'un état, élément clé du rapport complet de toxicologie. Cependant, il serait illusoire de penser que la pathologie, à elle seule, peut permettre de répondre à toutes les questions ou énigmes posées par une étude de toxicologie. Elle n'est qu'un élément, certes important, du rapport et doit être examinée à la lumière des autres données de l'étude, en particulier de celles en provenance de l'hématologie, de la biochimie, de la clinique et de ce que l'on connaît de la classe du produit examiné.

BIBLIOGRAPHIE

- OECD Principles of Good Laboratory Practice concerning Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals, 26 November 1997 (C (97) 186 Final).
- Principles of Good Laboratory Practice. French Official Journal of 23 March 2000.

