

L'Œil de l'animal de laboratoire dans l'évaluation de la toxicité d'un médicament

The eye of laboratory animals in drug safety evaluation

Par Catherine CHALIER⁽¹⁾ et Véronique BENNING⁽²⁾
(communication présentée le 16 février 2006)

RÉSUMÉ

Le principe de l'examen ophtalmologique d'un animal de laboratoire est identique à celui des espèces animales classiquement rencontrées dans la pratique clinique vétérinaire. Dans l'évaluation préclinique de la toxicité potentielle d'un futur médicament, les examens ophtalmologiques, dans les études de toxicologie générale, sont principalement réalisés sur des rongeurs (essentiellement le rat, mais aussi la souris) ainsi que sur le beagle de laboratoire, le macaque (*cynomolgus* ou *rhesus*) ou plus rarement le marmouset ou le mini-porc. Il est impératif de bien connaître les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, ainsi que les anomalies spontanées de l'œil de chaque espèce utilisée, afin de pouvoir évaluer la toxicité oculaire potentielle d'un produit à étudier. L'examen de la morphologie des différents segments oculaires, ainsi que l'examen microscopique de l'œil, sont systématiquement réalisés dans les études réglementaires de toxicologie générale selon une méthode et une fréquence bien définies. À ces examens de routine, peuvent s'ajouter des examens complémentaires du fait de l'effet pharmacologique du produit, d'un effet oculaire observé chez l'animal ou décrit chez le patient. Deux exemples d'études mécanistiques illustrent la variété des techniques et des modèles disponibles : la mise en évidence du potentiel cataractogène d'un produit au cours d'une étude de co-cataractogenèse chez le rat ; la mise en évidence d'un effet sur le fonctionnement de la rétine grâce à l'utilisation de l'électrorétinographie.

Mots-clés : animaux de laboratoire, toxicologie, ophtalmologie, étude de co-cataractogenèse, électrorétinographie.

SUMMARY

*Ophthalmologic examinations in laboratory animals are based on the same principle as that used in species routinely treated in veterinary practice. The main laboratory animal species used in toxicology studies are rodents (mostly rats and sometimes mice) as well as beagles and macaques (*cynomolgus*), and less frequently marmosets or mini-pigs. A sound knowledge of the morphological and functional characteristics, as well as of the spontaneous ocular anomalies found in each species is imperative to assess the potential ocular toxicity of a product. Macroscopic examination of the different eye segments, as well as microscopic examination are systematically performed in regulatory toxicity studies, using well-defined methodology and frequency. Further studies may be added to these routine examinations, based on the product's pharmacological activity, or on ocular changes observed in animals or in human patients. Two examples of mechanistic studies illustrate the variety of available techniques and models: investigation of cataractogenic potential of a drug in a co-cataractogenesis study in rats; and identification of an effect on retinal function using electroretinography.*

Key words: laboratory animals, toxicology, ophthalmology, co-cataractogenesis study, electroretinography.

(1) DVM, DABT, DEA de Toxicologie, CES d'Ophtalmologie Vétérinaire, DU d'Exploration de la Fonction Visuelle, Sanofi-Aventis, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville.

(2) DVM, DEA de Toxicologie, Diplôme d'Ophtalmologie Vétérinaire, Sanofi-Aventis, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville.

L'œil occupe une place privilégiée en tant qu'organe cible potentiel, dans l'évaluation de la sécurité d'un médicament. Les examens ophtalmologiques sont, depuis des années, intégrés dans les études précliniques de toxicité générale réalisées sur des animaux de laboratoire. À la bonne connaissance des particularités de ces animaux, s'ajoute maintenant la nécessité de s'adapter à l'évolution des techniques et du savoir, pour étudier de plus en plus finement les effets oculaires et mieux anticiper les risques éventuels pour le patient.

• L'ŒIL DES ANIMAUX DE LABORATOIRE : GÉNÉRALITÉS

L'examen ophtalmologique d'un animal de laboratoire est identique à celui des autres espèces animales classiquement rencontrées dans la pratique clinique vétérinaire. Il convient cependant d'adapter la technique d'observation à l'animal examiné.

En toxicologie générale, dont l'objectif principal est l'identification des organes cibles potentiels du futur médicament, les principaux animaux utilisés sont les rongeurs (essentiellement le rat, mais aussi la souris), ainsi que le chien beagle de laboratoire ou les primates non humains (surtout les macaques mais parfois les marmousets ou ouistitis) ou le mini-porc. Ces animaux proviennent tous d'élevages spécialisés et doivent satisfaire à des critères précis basés sur la souche, l'âge, le poids et l'état sanitaire en général. Ils constituent des lots homogènes de jeunes animaux, dont un premier « tri » chez l'éleveur permet d'éliminer ceux présentant des anomalies évidentes, notamment au niveau oculaire.

Afin de saisir les modifications éventuelles au niveau oculaire, il faut au préalable bien connaître l'aspect normal de l'œil et les différentes caractéristiques liées à l'espèce. Ainsi les rongeurs utilisés sont souvent albinos, sauf dans le cas bien précis où l'on voudra étudier l'influence de la présence de mélanine sur la toxicité potentielle du produit. L'œil albinos est aussi plus sensible aux effets de la lumière et aux phénomènes de phototoxicité (HEYWOOD, 1973). Enfin il n'y a pas d'accommodation possible chez le rongeur de laboratoire (dont le cristallin est quasiment sphérique), ce qui est par ailleurs cohérent avec sa nature d'animal nocturne. Ce modèle ne peut donc pas être utilisé pour l'étude d'effets possibles sur l'accommodation. L'œil du chien beagle de laboratoire ne présente pas de particularité par rapport à celui des autres chiens, mais la présence d'un tapis chez le chien en fait un animal particulier au plan ophtalmologique, puisque cette structure est absente chez les autres animaux utilisés dans nos études, et chez l'Homme. Ainsi, des modifications qui se limitent au tapis, comme c'est le cas avec certains médicaments (FORTNER *et al.*, 1993), ne seront pas automatiquement considérées comme un « risque » potentiel pour le patient. Enfin, la dernière espèce utilisée fréquemment dans les études pour le développement d'un médicament est le macaque (*Macaca fascicularis* ou *cynomolgus* et *Macaca rhesus*), dont l'œil est particulièrement proche de l'œil humain avec présence d'une macula, ce qui en fait une espèce de choix en terme de corrélation possible avec les données obtenues chez l'Homme. La figure 1 présente les fonds d'yeux des différentes espèces animales utilisées en toxicologie générale.

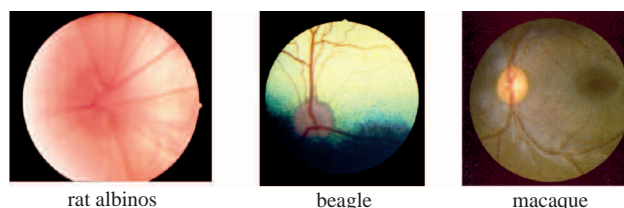


Figure 1 : Clichés de fonds d'œil chez les principales espèces animales utilisées en toxicologie générale.

Il est donc particulièrement important de connaître les anomalies spontanées rencontrées dans chaque espèce utilisée, afin de pouvoir juger d'un effet éventuel du produit étudié sur l'œil. Ainsi, les anomalies spontanées les plus fréquentes chez le rat de laboratoire (et variant avec la souche, l'origine, et l'âge) affectent la cornée (dystrophies, kératites...), l'iris (persistance de la membrane pupillaire, uvéites, synéchies...), le cristallin (sutures densifiées, opacités minimales jusqu'aux cataractes...), le vitré (hémorragies, vestiges de l'artère hyaloïde) ou la rétine (choriorétinites, dégénérescences focales/multifocales...) (TARADACH et GREAVES, 1984 ; HUBERT, GILLET et DURAND-CAVAGNA, 1994 ; WILLIAMS, 1999). Ces anomalies spontanées sont nettement moins fréquentes chez le chien de laboratoire et le macaque, mais sont souvent rédhibitoires pour l'inclusion dans une étude de toxicologie générale.

Quel que soit l'animal étudié, la technique d'examen et le matériel utilisé sont globalement les mêmes, avec comme base incontournable, l'examen à la lampe à fente et l'ophtalmoscopie. La contention doit être adaptée au type d'animal examiné. Si la majorité des animaux cités ci-dessus peuvent être examinés vigiles, les primates doivent être anesthésiés pour des raisons de sécurité. Ces examens sont réalisés de façon bien précise au cours des études précliniques, afin d'évaluer les effets potentiels de la molécule étudiée sur l'œil et la vision.

• OPHTHALMOLOGIE DES ANIMAUX DE LABORATOIRE : APPLICATION EN TOXICOLOGIE

La place de l'ophtalmologie dans l'évaluation de la sécurité d'un médicament est maintenant abordée en commençant par les examens de routine, puis en présentant deux exemples d'études mécanistiques : les études de co-cataractogénèse et l'électrorétinographie, de plus en plus fréquemment sollicitée comme outil d'investigation de la fonction rétinienne.

Les examens ophtalmologiques de routine en toxicologie

Ces examens ophtalmologiques (morphologie des différents segments de l'œil avec lampe à fente et ophtalmoscope) font partie des examens systématiquement demandés dans les études réglementaires, en accord avec les règles de l'ICH (International Conference for Harmonization), qui permettent à ces études d'être valides et acceptées pour l'enregistrement dans la majorité des pays.

Ces études doivent être réalisées chez un rongeur et un non-rongeur, classiquement le rat albinos (Sprague Dawley) et le beagle ou le Macaque *cynomolgus*. Un premier examen réa-

lisé avant le début du traitement permet d'éliminer les animaux qui présentent des anomalies oculaires et d'avoir un examen de référence pour les examens suivants. Par ailleurs, un ou plusieurs groupes d'animaux témoins, recevant un excipient et traités dans les mêmes conditions que ceux qui reçoivent le produit, permettent de différencier les effets liés à la manipulation et au stress de ceux liés au produit, surtout lorsqu'une anesthésie est nécessaire à l'examen. Plusieurs doses croissantes de produit sont étudiées, ce qui permet la mise en évidence d'un éventuel effet-dose, renforçant si besoin l'analyse des effets du produit. Ces examens sont aussi réalisés à des fréquences données selon la durée du traitement et de l'observation des animaux, ce qui permet l'étude des effets chroniques.

Toutes ces conditions expérimentales permettent, avec l'analyse de l'ensemble des observations, d'en faire ressortir un éventuel effet lié au produit administré. De plus, aux examens morphologiques de l'œil, s'ajoute son examen microscopique qui permet de vérifier les modifications morphologiques au niveau cellulaire. Tout effet sera confirmé ou non par d'autres études et chez une seconde espèce animale. La multiplication des observations renforcera ainsi la prédictivité du modèle animal pour les risques de toxicité chez l'Homme. La connaissance des animaux utilisés et celle de l'activité pharmacologique du produit sont des éléments clés dans cette analyse.

Toutes ces observations doivent être réalisées par un personnel compétent en ophtalmologie, mais aussi capable de travailler selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire, suivant des Procédures Opératoires, un Plan d'Étude assurant la traçabilité parfaite des données recueillies (« Données Brutes ») ; l'entretien de ces compétences par des formations et/ou par l'expérience sur le terrain doit être justifié ; un autre expert est éventuellement sollicité pour confirmer les observations au cours d'une « Peer Review » (revue par un « pair »). Dans ce cadre réglementaire, les résultats des examens ophtalmologiques seront présentés et éventuellement discutés à la lumière des autres résultats apportés par l'histopathologie ou encore la toxicocinétique.

Lorsque cela est jugé nécessaire, afin de mieux anticiper l'effet d'un produit sur l'œil et sa fonction, ou pour expliquer *a posteriori* un effet oculaire inattendu observé chez l'Homme, des examens ophtalmologiques complémentaires peuvent être réalisés, tels que la tonométrie, l'électrorétinographie, l'angiographie fluorescéinique, l'échographie, etc... ; ils permettront de répondre à une question précise. Ils seront alors réalisés dans le cadre d'études dites « mécanistiques ». Avec l'évolution technologique, il existe de plus en plus de variétés de techniques et de modèles disponibles (PEIFFER *et al.*, 2000). Deux exemples d'études explicatives sont présentés ci-après

Exemples d'études explicatives en toxicologie

Études de co-cataractogénèse

Les études de co-cataractogénèse ont pour but de montrer le potentiel cataractogène du produit à étudier. L'induction de cataracte est en effet un phénomène souvent long (plusieurs

mois) ou délicat à mettre en évidence. La co-administration du produit à étudier avec un produit de référence connu pour induire rapidement une cataracte évidente permet de voir dans les modèles décrits si l'apparition de cataracte est plus rapide et/ou plus brutale.

Le rat est l'animal de choix pour ce type d'étude. Du fait de sa petite taille, il est facilement manipulable et il est possible d'en utiliser un nombre suffisant pour réaliser des tests statistiques solides. L'utilisation de rats albinos et de rats pigmentés, ainsi que de deux modèles différents de cataracte, renforce la sensibilité de ce genre d'étude : la cataracte diabétique est induite par l'administration de streptozotocine chez le rat albinos et chez le rat pigmenté et la cataracte chimique, par le naphthalène chez le rat pigmenté (WEGENER et HOCKWIN, 1987).

Différents groupes sont constitués : des groupes d'animaux ne recevant qu'un des produits cataractogènes de référence et des groupes d'animaux recevant un cataractogène de référence plus le produit à étudier. Chaque semaine, l'examen du cristallin donne lieu à l'attribution d'un score de 1 (cristallin normal) à 6 (cataracte complète). La moyenne obtenue pour chaque groupe est comparée, afin de voir si la co-administration du produit accélère l'apparition de la cataracte. Cette étude, dont la durée est de quelques semaines, permet un gain de temps considérable par rapport aux études de toxicologie de routine au cours desquelles l'effet n'est souvent manifeste que chez quelques animaux et/ou après plusieurs mois de traitement. Mais il s'agit d'une étude lourde du fait du nombre d'animaux et d'examens à réaliser, souvent par deux ophtalmologistes indépendants et en double aveugle pour augmenter l'objectivité des résultats. La **figure 2** présente des images en lampe à fente de cristallins de rat pigmenté, illustrant les modifications morphologiques dans les deux modèles de cataractes induites.

Utilisation de l'électrorétinographie

Le deuxième exemple d'étude mécanistique fait intervenir l'utilisation, de mieux en mieux maîtrisée, de l'électrorétinographie comme outil non invasif d'exploration fonctionnelle de la rétine. Cette technique, utilisable chez tous les animaux de laboratoire, permet d'enregistrer la réponse d'une partie de la rétine (étage des photorécepteurs et des cellules bipolaires) à des flashes lumineux de longueur d'onde, d'intensité et de fréquence bien définies. Ces enregistrements sont analysés qualitativement et quantitativement, l'obtention de valeurs chiffrées permettant l'utilisation de tests statistiques et une relative objectivité.

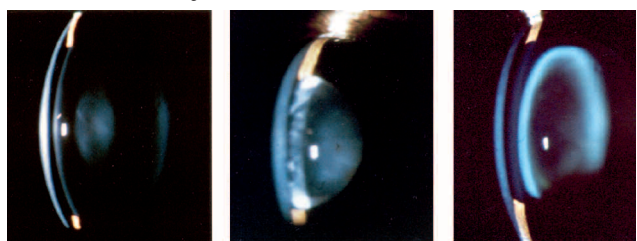


Figure 2 : Coupes, en lampe à fente, de cristallins de rat pigmenté, illustrant les modifications morphologiques dans deux modèles de cataracte.

Tout comme lors des examens de routine, il est indispensable d'obtenir avant le début de l'étude, des enregistrements de base, permettant de vérifier la qualité de la réponse rétinienne avant traitement, et de comparer ensuite la réponse obtenue après traitement à ces valeurs de référence. Il est aussi important de comparer entre eux des groupes témoins et traités par le produit à des doses croissantes pour renforcer l'analyse, comme vu précédemment.

Enfin les choix du protocole, standardisé selon l'ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision), ou bien adapté à une question particulière des conditions expérimentales, permettent d'obtenir de façon sélective la réponse du système des cônes et de celui des bâtonnets (NARFSTRÖM *et al.*, 2002 ; ROSOLEN *et al.*, 2005). Si les conditions expérimentales sont rigoureuses, cela permet d'avoir une idée assez précise et/ou précoce des effets du produit étudié sur différentes populations de cellules rétiniennes, même en l'absence de modifications morphologiques. Tout paramètre modifié devient ainsi un marqueur souvent précoce de l'effet du produit (pharmacologique ou toxique), d'autant plus intéressant qu'il peut être retrouvé chez l'animal de laboratoire comme chez l'Homme et permettre une meilleure extrapolation interspèce. Parmi nos animaux de laboratoire, l'œil de macaque est le modèle le plus proche de l'œil humain et donc le mieux adapté à cet égard à l'étude de la rétine ; mais il faut aussi tenir compte des particularités du métabolisme ou de la toxicité du produit étudié pour confirmer que cette espèce est vraiment la mieux adaptée.

Depuis quelques années, l'électrorétinographie est devenue un examen régulièrement réalisé, spontanément au cours du développement d'un médicament ou à la demande

des Agences Réglementaires, afin d'obtenir des compléments d'information : lors de suspicion d'un effet sur la rétine du fait de l'activité pharmacologique du produit ou de modifications morphologiques observées dans les études réglementaires, ou encore à la demande de cliniciens cherchant à expliquer un effet sur la fonction visuelle chez l'Homme. Ainsi, le « sildénafil », inhibiteur de la phosphodiesterase de type V, a aussi un effet sur la phosphodiesterase de type VI, à l'origine des troubles visuels décrits par les patients : l'effet de cette molécule sur la fonction rétinienne a ainsi été évalué par électrorétinographie dans des études précliniques, mettant en évidence le caractère modéré et réversible des altérations rétiniennes, en relation avec les pics plasmatiques de produit (LATIES et ZRENNER, 2002).

L'essor de cette technique ne peut correctement se faire que grâce à une formation adaptée des vétérinaires ophtalmologistes car, plus que jamais, la connaissance précise de la physiologie de la rétine et des différences inter-espèces (JACOBS, 1993), ainsi que l'utilisation d'une méthodologie rigoureuse et harmonisée entre laboratoires (pour permettre des comparaisons inter-sites), sont indispensables.

• CONCLUSION

Il est fondamental de connaître les outils utilisés pour comprendre les résultats obtenus lors des examens ophtalmologiques, à commencer par les animaux de laboratoire et leurs spécificités. L'enchaînement des examens doit être logique, du plus simple au plus complexe, toujours justifié, et s'inscrire dans la stratégie globale de développement du produit étudié avec comme objectifs constants, la qualité de l'information obtenue et la sécurité du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- FORTNER JH, MILISEN WB, LUNDEEN GR, JAKOWSKI AB, MARSH PM (1993) Tapetal effect of an azalide antibiotic following oral administration in Beagle dogs. *Fundamental and Applied Toxicology*, **21**, 164-173.
- HEYWOOD R (1973) Some clinical observations on the eyes of Sprague Dawley rats. *Laboratory Animals*, **7**, 19-27.
- HUBERT MF, GILLET JP, DURAND-CAVAGNA G (1994) Spontaneous retinal changes in Sprague Dawley rats. *Lab. Animal Sci.*, **44**, 561-567.
- JACOBS GH (1993) The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol. Rev.*, **68**, 413-471.
- LATIES AM, ZRENNER E (2002) Viagra® (sildenafil citrate) and ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, **21**, 485-506.
- NARFSTRÖM K, EKESTEN B, ROSOLEN SG, SPIESS BM, PERCICOT CL, OFRI R (2002) Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc. Ophthalmol.*, **105**, 83-92.
- PEIFFER RL, McCARY B, BEE W, WEGENER A, GELLER AM, BOYES WK (2000) Contemporary methods in ocular toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **10**, 17-39.
- ROSOLEN SG, RIGAUDIERE F, LE GARGASSON J-F, BRIGELL MG (2005) Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc. Ophthalmol.*, **110**, 57-66.
- TARADACH C, GREAVES P (1984) Spontaneous eye lesions in laboratory animals: incidence in relation to age. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, **12**, 121-147.
- WEGENER A, HOCKWIN O (1987) Animal model as a tool to detect the subliminal cataractogenic potential of drugs. *Concepts Toxicol.*, **4**, 250-262.
- WILLIAMS D.L. (1999) Laboratory animal ophthalmology. In: GELATT KN, editor. *Veterinary ophthalmology*, 3rd ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1209-1236.