



LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L'INDUSTRIE

ÉTUDES POUR ÉVALUER L'INNOCUITÉ DES RÉSIDUS DE
MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES ALIMENTS
DESTINÉS AUX HUMAINS : ÉVALUATION DE LA
GÉNOTOXICITÉ

VICH GL23

Date d'approbation par la DMV	2003-11-01
Date mise en vigueur	2003-11-01
Date de révision	2004-06-02

Direction des médicaments vétérinaires
Ligne directrice

Canada

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice, élaborée par des groupes d'experts, a été approuvée par le Comité directeur du VICH. Les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis l'ont déjà adoptée.

En l'adoptant aussi, le gouvernement du Canada retient les principes et les pratiques qui y sont décrits. Son utilisation doit toutefois se faire parallèlement aux sections pertinentes des autres lignes directrices qui s'appliquent.

Les lignes directrices ont pour objectif d'aider l'industrie et les professionnels de la santé à se conformer aux politiques, aux lois et aux règlements du gouvernement du Canada. Elles servent également de guide, en matière d'examen et d'évaluation de la conformité, aux employés du gouvernement du Canada en vue d'assurer une application équitable, uniforme et efficace des politiques et des lignes directrices.

Les lignes directrices constituent des outils administratifs qui n'ont pas force de loi et, de ce fait, elles autorisent une certaine souplesse quant aux approches à suivre. Des approches différentes, qui s'écartent des principes et des pratiques que proposent ces lignes directrices, peuvent être acceptées, si elles sont appuyées par une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être discutées au préalable pour éviter la possibilité qu'on détermine, lors des évaluations, que les exigences des lois et des règlements n'ont pas été rencontrées.

Il est important de souligner que le gouvernement du Canada se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire ou d'énoncer des conditions, qui ne se trouvent pas dans la présente ligne directrice, afin de permettre aux évaluateurs de déterminer correctement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité des médicaments vétérinaires. Le gouvernement du Canada s'est assuré que de telles demandes soient justifiées et que ses décisions soient clairement documentées.

1. INTRODUCTION 1

1.1	Objectif de la directive.....	1
1.2	Renseignements de base.....	1
1.3	Portée de la directive.....	1
2.	BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES.....	2
3.	MODIFICATIONS DE LA BATTERIE NORMALISÉE.....	3
3.1	Antimicrobiens.....	3
3.2	Activation métabolique.....	3
4.	MARCHE À SUIVRE POUR LES ÉPREUVES.....	3
4.1	Tests sur bactéries.....	3
4.2	Test <i>in vitro</i> de détection des effets chromosomiques dans des cellules de mammifères.....	3
4.3	Test <i>in vitro</i> de détection des mutations géniques dans des cellules de mammifères.....	4
4.4	Test <i>in vivo</i> de détection des effets chromosomiques.....	4
	ÉVALUATION DES RÉSULTATS DES TESTS.....	4
	RÉFÉRENCES.....	4
	GLOSSAIRE.....	6

1. INTRODUCTION

1.1 Objectif de la directive

Afin de déterminer l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments destinés aux humains, un certain nombre d'évaluations toxicologiques doivent être effectuées, notamment une étude des risques possibles associés à l'activité génotoxique. De nombreuses substances cancérigènes ont un mode d'action génotoxique et il est prudent de considérer les génotoxines comme des agents cancérigènes potentiels à moins que des données solides ne prouvent le contraire. De plus, les substances causant des effets toxiques sur la reproduction ou le développement peuvent avoir un mode d'action faisant intervenir des mécanismes génotoxiques. Les résultats des tests de génotoxicité n'influencent pas habituellement sur la valeur numérique de la dose journalière admissible (DJA), mais peuvent indiquer s'il est possible ou non d'établir une DJA.

La présente directive vise à garantir l'harmonisation internationale des tests de génotoxicité.

1.2 Renseignements de base

On a observé des différences dans les exigences relatives aux tests de génotoxicité aux Etats-Unis (E.-U.), au Japon et dans l'Union européenne (U.E.) pour la détermination de l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments destinés aux humains.

Le présent document fait partie d'une série de directives élaborées par la VICH en vue de faciliter l'acceptation mutuelle des données sur l'innocuité requises pour la détermination par les autorités réglementaires compétentes de doses journalières admissibles (DJA) des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments destinés aux humains. Cette directive devrait être lue conjointement avec la directive sur la stratégie générale d'évaluation de l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments destinés aux humains (voir la directive 33 de la VICH). La présente directive de la VICH a été élaborée après examen des lignes directrices existantes de l'ICH pour les produits pharmaceutiques à usage humain : « Génotoxicité : Batterie d'épreuves normalisées pour l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques » et « Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : Aspects particuliers ». On a également tenu compte des lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, des lignes directrices nationales et régionales ainsi que des pratiques d'évaluation des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments destinés aux humains en vigueur dans l'U.E., au Japon, aux É.-U., en Australie, en Nouvelle-Zélande et au Canada.

1.3 Portée de la directive

La présente directive propose une batterie d'épreuves normalisées qui peuvent être utilisées pour l'évaluation de la génotoxicité de médicaments vétérinaires. Dans la plupart des cas, les résultats donneront une bonne idée du caractère génotoxique ou non du matériel étudié. La batterie d'épreuves normalisées ne convient pas cependant à certaines classes de médicaments vétérinaires. Par exemple, certains antimicrobiens peuvent être toxiques pour les souches de contrôle utilisées dans le test de détection des mutations géniques dans des bactéries. La présente directive recommande des modifications à apporter à la batterie d'épreuves de base pour l'évaluation de ces médicaments. Dans certains cas, les résultats de la batterie d'épreuves normalisées ou modifiées peuvent ne pas être clairs ou peuvent être équivoques, des conseils sont donc fournis concernant l'évaluation et l'interprétation des résultats. D'autres tests peuvent être nécessaires dans certains cas, p. ex. les substances ayant potentiellement des effets aneugéniques ou des effets sur les cellules germinales.

Dans la plupart des cas, c'est la substance contenue dans le médicament mère qui est testée, bien qu'il faille parfois tester également un ou plusieurs des principaux métabolites qui se retrouvent sous forme de résidus dans les aliments. Les situations suivantes sont des exemples de cas où il est nécessaire de tester un métabolite : lorsque le métabolite contient des signaux structuraux qui ne

sont pas présents dans la structure moléculaire du médicament mère et lorsque les résidus dans les aliments se présentent surtout sous la forme d'un métabolite dont la structure moléculaire est fondamentalement différente de celle du médicament mère. On présume habituellement que les sels, les esters, les conjugués et les résidus liés ont les mêmes propriétés génotoxiques que le médicament mère, à moins qu'on puisse démontrer le contraire.

2. BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES

Il est recommandé d'utiliser la batterie constituée des trois tests suivants comme épreuves de triage des médicaments vétérinaires pour la détection de la génotoxicité :

Un test de détection des mutations géniques dans des bactéries.

Un test *in vitro* de détection des effets chromosomiques dans des cellules de mammifères.

Un test *in vivo* de détection des effets chromosomiques dans des cellules hématopoïétiques de rongeurs.

Afin de faciliter l'étude des mutations géniques dans des bactéries, une vaste base de données a été constituée pour les essais de mutation réverse sur bactéries dans des souches de *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. Les souches les mieux validées sont les souches TA1535, TA1537 (ou TA97 ou TA97a), TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium*. Il peut ne pas être possible de détecter dans ces souches certains agents mutagènes oxydants et agents de couplage; pour corriger ce problème, des souches WP2 (pKM101), WP2uvrA (pKM101) d'*Escherichia coli* ou des souches TA102 de *Salmonella typhimurium* devraient également être utilisées dans l'essai sur bactéries. L'essai de mutation génique sur des bactéries, même s'il effectue un tri primaire efficace pour la détection de composés ayant le potentiel intrinsèque d'induire des mutations géniques, ne détecte pas cependant tous les composés ayant un potentiel mutagène. Certains composés clastogènes ne produisent pas de mutations dans le test sur les salmonelles (p. ex. composés d'arsenic inorganiques).

Le deuxième test devrait évaluer si un produit chimique a le potentiel de produire des effets chromosomiques. Dans l'U.E., on préfère le test cytogénétique *in vitro* faisant appel à une analyse en métaphase, qui détecte à la fois le potentiel clastogène et le pouvoir aneugène. Aux É.-U., l'épreuve sur cellules de lymphome murin est privilégiée; elle permet, après modification, de détecter les mutations géniques comme les lésions chromosomiques. L'un ou l'autre test est acceptable au Japon.

Un troisième test a été ajouté à la batterie d'épreuves normalisées afin d'offrir une garantie supplémentaire que cette batterie permettra de détecter tous les mutagènes potentiels. La VICH est bien au fait que pour l'évaluation de certaines classes de produits chimiques, certaines autorités recommandent l'utilisation d'une batterie initiale d'épreuves de mutagénicité qui ne comporte que des épreuves *in vitro*, les tests *in vivo* n'étant requis que si les épreuves *in vitro* donnent un résultat positif ou équivoque. La VICH a examiné cette approche mais a décidé d'inclure une épreuve *in vivo* dans sa batterie de base afin d'harmoniser ses recommandations avec les exigences de l'ICH pour l'évaluation de la génotoxicité des médicaments à usage humain. Ce pourrait être un test du micronoyau ou une épreuve cytogénétique.

3. MODIFICATIONS DE LA BATTERIE NORMALISÉE

Pour la plupart des substances, la batterie d'épreuves normalisées devrait suffire, mais dans quelques cas, il peut être nécessaire de modifier l'éventail de tests ou les protocoles d'une ou plusieurs épreuves. Les propriétés physicochimiques d'une substance (p. ex. volatilité, pH, solubilité, stabilité, etc.) peuvent parfois faire en sorte que certaines conditions standard d'évaluation ne conviennent pas. Il est essentiel d'en tenir compte avant de réaliser les tests. Des protocoles modifiés devraient être utilisés lorsqu'il appert que les conditions standard donneront un résultat faussement négatif. Les lignes directrices pour les essais de produits chimiques adoptées par l'OCDE pour l'évaluation de la génotoxicité fournissent des conseils concernant la sensibilité de certains tests aux caractéristiques physiques du matériel testé et les mesures de compensation qui pourraient être prises. Les médicaments analysés au moyen d'autres batteries d'épreuves de détection de la génotoxicité seront examinés au cas par cas. Une explication scientifique devra être donnée pour justifier pourquoi la batterie d'épreuves normalisées n'a pas été utilisée.

3.1 Antimicrobiens

Certaines substances antimicrobiennes sont très toxiques pour les bactéries et sont donc très difficiles à analyser au moyen d'épreuves bactériennes. Dans ce cas, il serait indiqué d'effectuer une épreuve sur bactéries en utilisant des concentrations qui ne dépassent pas la limite de cytotoxicité et de compléter cette épreuve par un essai *in vitro* de mutation génique dans des cellules de mammifères.

3.2 Activation métabolique

L'épreuve *in vitro* devrait être effectuée avec ou sans système d'activation métabolique. Le système d'activation métabolique le plus couramment utilisé est le mélange S9 préparé à partir de foies de rats traités à l'aide d'un inducteur enzymatique (Aroclor 1254 ou un mélange de phénobarbital et de bêta-naphthoflavone). D'autres systèmes peuvent toutefois être utilisés. Une explication scientifique devrait être fournie pour justifier le choix d'un autre système d'activation métabolique.

4. MARCHE À SUIVRE POUR LES ÉPREUVES

4.1 Tests sur bactéries

Un essai de mutation réverse sur bactéries devrait être effectué conformément au protocole décrit dans l'Essai n° 471¹ de l'OCDE.

4.2 Test *in vitro* de détection des effets chromosomiques dans des cellules de mammifères

Les tests de détection des aberrations chromosomiques devraient être effectués conformément à l'Essai n° 473² de l'OCDE. Ces épreuves cytogénétiques devraient détecter le potentiel clastogène et peut-être également l'hétéroploïdie. Pour détecter l'induction de la polyploïdie, un traitement continu plus long (p. ex. 3 cycles cellulaires normaux) peut donner une plus grande sensibilité. On peut obtenir quelques renseignements sur le potentiel aneugène en notant l'incidence de l'hyperploïdie, de la polyploïdie ou la modification de l'index mitotique dans l'épreuve cytogénétique. S'il y a des indicateurs du pouvoir aneugène (p. ex. induction de la polyploïdie), le phénomène devrait être confirmé à l'aide de techniques de coloration appropriées, telles que la technique FISH (hybridation *in situ* fluorescente) ou le marquage chromosomique (*chromosome painting*). Comme les artéfacts peuvent entraîner une disparition apparente de chromosomes, seule l'hyperploïdie devrait être considérée comme un signe manifeste d'aneuploïdie induite.

Si l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène tk est effectuée, on devrait utiliser un protocole modifié afin d'inclure des mesures de grosses et petites colonies. Le protocole devrait être conforme aux critères établis dans l'Essai n° 476⁵ de l'OCDE et devrait prévoir l'utilisation de témoins positifs appropriés (clastogènes).

4.3 Test *in vitro* de détection des mutations géniques dans des cellules de mammifères

Lorsqu'on a recours à une épreuve *in vitro* de détection des mutations géniques dans des cellules de mammifères, il faut procéder conformément à l'Essai n° 476⁵ de l'OCDE.

4.4 Test *in vivo* de détection des effets chromosomiques

On peut effectuer soit un test du micronoyau sur des érythrocytes de mammifères (Essai n° 474³ de l'OCDE) ou un test de détection des aberrations chromosomiques sur moelle osseuse de mammifères (Essai n° 475⁴ de l'OCDE) dans le cadre de la batterie initiale de tests de génotoxicité. Le test du micronoyau sur des érythrocytes de mammifères peut porter soit sur la moelle osseuse ou sur le sang périphérique. Si l'on analyse le sang périphérique, l'espèce étudiée devrait être la souris et non le rat, car la rate du rat retire les érythrocytes micronucléés en circulation.

Ces épreuves visent à donner une réponse qualitative à la question concernant la capacité d'une substance d'exprimer ou non un effet génotoxique *in vivo* et non pas à établir les doses sans effet.

ÉVALUATION DES RÉSULTATS DES TESTS

L'évaluation du potentiel génotoxique d'un composé devrait tenir compte de l'ensemble des conclusions et reconnaître les valeurs et les limites intrinsèques des épreuves *in vitro* et *in vivo*.

De toute évidence, l'obtention de résultats négatifs en ce qui concerne la génotoxicité dans une série de tests, y compris la batterie d'épreuves normalisées, sera habituellement considérée comme une preuve suffisante de l'absence d'effets génotoxiques.

Si les résultats des tests de génotoxicité *in vitro* d'une substance sont nettement positifs mais sont nettement négatifs dans les tests de génotoxicité *in vivo* sur la moelle osseuse, il sera nécessaire de confirmer le caractère génotoxique ou non de la substance au moyen d'un autre test *in vivo* de génotoxicité sur un tissu cible autre que la moelle osseuse. Il faudra choisir le test qui convient le mieux au cas par cas.

Si l'on obtient d'autres résultats positifs ou équivoques à l'aide de la batterie d'épreuves normalisées, il faudra décider dans chaque cas s'il est nécessaire d'effectuer d'autres tests.

RÉFÉRENCES

1. OCDE. 1997, Essai n° 471, Essai de mutation réverse sur des bactéries. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
2. OCDE. 1997, Essai n° 473, Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
3. OCDE. 1997, Essai n° 474, Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

4. OCDE. 1997, Essai n° 475, Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

5. OECD. 1997, Essai n° 476, Essai *in vitro* de mutation génique sur les cellules de mammifères. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

GLOSSAIRE

- Aneuploïdie :** Écart numérique du nombre modal de chromosomes dans une cellule ou dans un organisme, autre qu'un nombre de jeux complets de chromosomes en plus ou en moins.
- Clastogène :** Agent provoquant des changements structurels dans les chromosomes habituellement observables par microscopie optique.
- Cytogénétique :** Analyse chromosomique de cellules, normalement effectuée sur des cellules en division lorsque les chromosomes sont condensés et visibles à la microscopie optique après coloration.
- Génotoxicité :** Terme général qui désigne tout changement délétère dans le matériel génétique, peu importe le mécanisme à l'origine du changement.
- Hétéroplôïdie :** Nombre anormal de chromosomes dans une cellule ou un organisme. C'est un terme générique qui englobe la polyploïdie, l'aneuploïdie, l'hyperploïdie, etc.
- Hyperploïdie :** Nombre excédentaire de chromosomes par rapport à la normale dans une cellule ou un organisme.
- Micronoyau :** Particule d'une cellule observable au microscope et qui contient de l'ADN nucléaire. Il peut s'agir d'un ou de plusieurs chromosomes entiers ou d'une ou plusieurs portions centriques ou acentriques d'un ou de plusieurs chromosomes. Le micronoyau est habituellement défini comme un fragment dont la taille est moindre que le 1/5 mais plus grande que le 1/20 de la taille du noyau principal.
- Mutagénicité :** Capacité de causer un changement permanent dans la quantité ou la structure du matériel génétique dans un organisme ou une cellule, qui peut entraîner un changement dans les caractéristiques de l'organisme ou de la cellule. La modification peut consister en des changements dans la séquence des bases de l'acide nucléique (mutation génique), des changements structurels dans les chromosomes (potentiel clastogène) ou des changements dans le nombre de chromosomes dans les cellules (aneuploïdie ou polyploïdie).
- Mutation génique :** Changement permanent observable à l'intérieur d'un gène unique ou perturbation de la séquence du code génétique. Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle, d'une insertion, d'une délétion, etc.
- Polyploïdie :** Nombre excédentaire ou réduit de jeux complets de chromosomes.
- Potentiel clastogène :** Capacité de causer des changements structurels des chromosomes (aberrations chromosomiques).
- Pouvoir aneugène :** Capacité de causer une aneuploïdie.