



## Avis

Notre référence : 15-114056-97

**L'adoption pour International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ligne directrice : S8: Produits pharmaceutiques à usage humain études d'immunotoxicité**

Santé Canada a le plaisir d'annoncer l'adoption de cette ligne directrice de l'ICH S8 : Produits pharmaceutiques à usage humain études d'immunotoxicité.

Cette ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, Santé Canada fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec cette d'avis d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Santé Canada.

Santé Canada est conscient que la portée et l'objet de ses lignes directrices actuelles peuvent ne pas toujours correspondre en totalité à ceux des lignes directrices de l'ICH qui sont introduites dans le cadre de l'engagement du Santé Canada envers l'harmonisation à l'échelle internationale et le Processus de l'ICH. Dans de tels cas, les lignes directrices de l'ICH adoptées par du Santé Canada auront préséance.

Santé Canada a pris l'engagement d'éliminer ces incohérences par la mise en oeuvre d'un plan de travail graduel qui examinera l'impact lié à l'adoption des lignes directrices de l'ICH. Ce processus aboutira à la modification ou, si les révisions à apporter sont trop nombreuses, au retrait de certaines lignes directrices du Santé Canada.

Plusieurs lignes directrices, incluant celle-ci, sont disponibles sur le site Web de la Santé Canada (<http://www.hc-sc.gc.ca/index-fra.php>).

Si vous avez des questions ou commentaires concernant cette ligne directrice, veuillez communiquer avec :

**Bureau du métabolisme, de l'oncologie et des sciences de la reproduction (BMOSR)**

Courriel : [Enquetes\\_bmosr@hc-sc.gc.ca](mailto:Enquetes_bmosr@hc-sc.gc.ca)

Téléphone : 613-941-3171

Télécopieur : 613-941-1365



## LIGNE DIRECTRICE

Produits pharmaceutiques à usage humain études  
d'immunotoxicité  
ICH thème S8

Publication autorisée par le  
ministre de la Santé

Date d'approbation	2016/01/22
Date mis en vigueur	2016/01/22

Direction générale des produits de santé et des aliments

<p>Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.</p> <p style="text-align: right;"><i>Santé Canada</i></p>	<p>Le mandat de la Direction générale des produits de santé et des aliments (DGPSA) est d'adopter une approche intégrée à la gestion des risques et des avantages pour la santé liés aux produits de santé et aux aliments :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• en réduisant considérablement les facteurs de risque pour la santé de la population canadienne tout en maximalisant la sûreté que procure le système de réglementation des produits de santé et des aliments; et</li> <li>• en favorisant des conditions qui permettent aux Canadiens et aux Canadiennes de faire des choix sains et en leur fournissant les renseignements nécessaires pour qu'ils prennent des décisions éclairées quant à leur santé.</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Direction générale des produits de santé et de aliments</i></p>
--	--

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2016

*also available in English under the following Title: S8: Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals*

## AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, Santé Canada fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec la lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables à Santé Canada.

Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la **façon** de se conformer aux politiques et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer les mandats d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas force de loi, ce qui permet une certaine souplesse d'approche. Les principes et les pratiques énoncés dans le présent document **pourraient être** remplacés par d'autres approches, à condition que celles-ci s'appuient sur une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être examinées préalablement en consultation avec le programme concerné pour s'assurer qu'elles respectent les exigences des lois et des règlements applicables.

Corollairement à ce qui précède, il importe également de mentionner que Santé Canada se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire, ou de définir des conditions dont il n'est pas explicitement question dans la ligne directrice, et ce, afin que le ministère puisse être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Santé Canada s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

Ce document doit accompagner cet avis et les sections appropriées des autres lignes directrices concernées.

### Historique du document

Première codification	Historique	Date	Nouvelle codification <b>Novembre 2005</b>
S8	Approbation par le Comité directeur à l'étape 2 et diffusion aux fins de consultation publique.	18 novembre 2004	S8

### Version la plus récente de l'étape 4

S8	Approbation par le Comité directeur à l'étape 4 et adoption recommandée aux trois organismes de réglementation de l'ICH.	15 septembre 2005	S8
----	--	-------------------	----

## Table des matières

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectif de la directive .....	1
1.2 Contexte .....	1
1.3 Portée de la directive .....	2
1.4 Aperçu .....	2
2. DIRECTIVE .....	3
2.1 Facteurs à considérer dans l'évaluation de l'immunotoxicité potentielle des médicaments.....	3
2.1.1 Épreuves de toxicité normalisées.....	3
2.1.2 Propriétés pharmacologiques .....	4
2.1.3 Population de patients visée.....	4
2.1.4 Ressemblances structurelles.....	4
2.1.5 Élimination des médicaments .....	5
2.1.6 Signes observés lors d'essais cliniques ou à la suite d'une utilisation clinique.....	5
2.2 Examen du poids de la preuve.....	5
3. ÉPREUVES D'IMMUNOTOXICITÉ SUPPLÉMENTAIRES - SÉLECTION ET ÉLABORATION .....	5
3.1 Objectifs .....	5
3.2 Sélection des essais .....	5
3.3 Plan d'étude.....	6
3.4 Évaluation des résultats des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires et détermination de la nécessité de réaliser d'autres épreuves.....	6
4. MOMENT DE LA RÉALISATION DES ÉPREUVES D'IMMUNOTOXICITÉ PAR RAPPORT AUX ESSAIS CLINIQUES .....	7
5. RÉFÉRENCES .....	7
ANNEXE : Méthodes d'évaluation de l'immunotoxicité.....	9

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Objectif de la directive

Le présent document a pour objectif de fournir : 1) des recommandations sur les méthodes des essais non cliniques visant à identifier des composés potentiellement immunotoxiques et 2) une orientation à une méthode de prise de décision fondée sur le poids de la preuve pour ce qui est des épreuves d'immunotoxicité. L'immunotoxicité se définit, pour les fins de la présente directive, comme une suppression ou une stimulation non intentionnelle du système immunitaire; elle n'englobe pas l'hypersensibilité ou l'auto-immunité provoquées par des médicaments.

### 1.2 Contexte

L'évaluation des effets indésirables potentiels sur le système immunitaire devrait faire partie des normes de mise au point des médicaments à usage humain. L'immunotoxicité englobe un éventail d'effets indésirables, notamment la suppression ou la stimulation de la réponse immunitaire. L'immunosuppression peut diminuer la résistance de l'hôte aux agents infectieux et aux cellules tumorales, et l'immunostimulation peut aggraver les maladies auto-immunes et l'hypersensibilité. Des complexes médicamenteux ou médicament-protéine pourraient également être considérés étrangers et entraîner une réponse immunitaire contre le médicament. Des expositions ultérieures au même médicament peuvent déclencher des réactions d'hypersensibilité (réactions allergiques). Par le passé, une grande partie de la recherche et des efforts d'élaboration et de validation de méthodes visaient à évaluer si des médicaments candidats étaient susceptibles de provoquer une immunosuppression ou une sensibilisation par contact. Il n'existe encore aucune méthode normalisée pour évaluer le pouvoir allergisant (ou antigénique) des produits pharmaceutiques à usage humain pour l'appareil respiratoire ou l'organisme en général ou pour évaluer les réactions auto-immunes qu'ils engendrent. Les études en ce sens ne sont actuellement requises nulle part, et les méthodes permettant d'évaluer la sensibilisation cutanée ne diffèrent pas d'une région à l'autre.

La suppression et la stimulation des réactions immunitaires peuvent être attribuables à des médicaments de deux groupes distincts :

- 1) Les médicaments dont la fonction est de moduler la réponse immunitaire à des fins thérapeutiques (p. ex. pour éviter le rejet d'une greffe). Dans un tel cas, une immunosuppression indésirable est considérée comme le résultat d'une activité pharmacodynamique exagérée.
- 2) Les médicaments dont la fonction n'est pas d'agir sur le système immunitaire, mais qui s'avèrent immunotoxiques, notamment parce qu'ils entraînent la nécrose ou l'apoptose de cellules immunitaires ou qu'ils se lient à des récepteurs communs aux tissus cibles et aux cellules immunitaires non ciblées.

Par exemple, les agents antiprolifératifs utilisés pour lutter contre le cancer sont des médicaments qui provoquent une immunosuppression non intentionnelle. Dans de tels cas, on peut prévoir l'immunotoxicité pour l'humain sans difficulté, d'après les réactions indésirables observées lors d'études non cliniques. En d'autres termes, il n'est probablement pas utile d'effectuer des essais d'immunotoxicité particuliers pour évaluer les risques associés aux médicaments, car les tissus cibles sont normalement constitués de cellules qui se divisent rapidement, comme les progéniteurs myéloïdes du système immunitaire. Ainsi, on peut prévoir les effets indésirables d'un médicament sur la fonction immunitaire à partir de son activité pharmacologique et, habituellement, les évaluer de façon fiable au moyen d'études non cliniques. En ce qui concerne les composés non destinés à supprimer la réponse immunitaire, il peut être difficile de distinguer entre une activité pharmacodynamique exagérée et un effet sur des tissus non ciblés. Ainsi, des anti-inflammatoires influent sur certains mécanismes de l'immunité innée, mais pas nécessairement sur la réponse immunitaire adaptative.

### 1.3 Portée de la directive

La présente directive vise à fournir des recommandations relatives aux études non cliniques sur l'immunotoxicité des produits pharmaceutiques à usage humain; elle ne porte que sur l'immunosuppression et l'immunostimulation non intentionnelles et ne tient pas compte du pouvoir allergisant des médicaments ni de l'auto-immunité que ces derniers peuvent provoquer.

La présente directive s'applique à l'utilisation de nouveaux produits pharmaceutiques à usage humain, ainsi qu'à l'utilisation de médicaments déjà sur le marché à des fins autres que celles initialement prévues et à toute modification de l'étiquette lorsque ces changements peuvent entraîner des effets immunotoxicologiques imprévus et significatifs. Elle peut également s'appliquer lorsqu'on observe des signes cliniques d'immunotoxicité pendant les essais cliniques ou après l'autorisation de mise en marché. La directive ne s'applique toutefois pas aux produits pharmaceutiques issus de la biotechnologie visés par la Directive tripartite harmonisée de l'ICH (S6)<sup>1</sup> ou aux autres produits biologiques.

Les documents d'orientation actuels sur la sensibilisation ou l'hypersensibilité demeurent en vigueur et ne sont pas modifiés par le présent document, lequel ne contient pas de conseils précis sur la façon d'effectuer chaque épreuve d'immunotoxicité. Des conseils généraux sur les méthodes se trouvent en annexe.

### 1.4 Aperçu

La présente directive est fondée sur les principes généraux suivants :

- 1) Évaluer le potentiel immunotoxique de tous les nouveaux produits pharmaceutiques à usage humain.



- 2) Effectuer des épreuves de toxicité normalisées et, au besoin, des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires, à la lumière d'un examen du poids de la preuve fondé sur l'information associée aux facteurs de la section 2.1.

La description de la directive présentée ci-dessous se fera conformément au processus d'évaluation de l'immunotoxicité présenté à la figure 1. On trouvera une description détaillée des méthodes d'essais en annexe.

## **2. DIRECTIVE**

### **2.1 Facteurs à considérer dans l'évaluation de l'immunotoxicité potentielle des médicaments**

Les facteurs qui peuvent nécessiter la réalisation d'épreuves d'immunotoxicité supplémentaires ont trait aux aspects suivants : 1) résultats des épreuves de toxicité normalisées, 2) propriétés pharmacologiques des médicaments, 3) population de patients visée, 4) ressemblances structurales avec des immunomodulateurs connus, 5) élimination des médicaments, 6) données cliniques.

La première étape dans la recherche de signes d'immunotoxicité consiste à effectuer des épreuves de toxicité normalisées. Il faut tenir compte des données tirées d'études de courte durée et d'études à doses répétées de longue durée faisant intervenir des rongeurs ou d'autres animaux. Des détails additionnels sur les paramètres à évaluer et la présentation des résultats histopathologiques sont fournis en annexe.

#### ***2.1.1 Épreuves de toxicité normalisées***

Il faut rechercher les signes d'immunotoxicité suivants dans les résultats des épreuves de toxicité normalisées (ETN) :

- 1) Altérations hématologiques : leucocytopénie/leucocytose, granulocytopénie/granulocytose ou lymphopénie/lymphocytose;
- 2) Variations pondérales et/ou altérations histologiques des organes du système immunitaire (p. ex. thymus, rate, ganglions lymphatiques et/ou moelle osseuse);
- 3) Variation de la globulinémie survenant sans explication plausible; ainsi, une atteinte du foie ou du rein peut être révélatrice d'une variation de l'immunoglobulinémie;
- 4) Augmentation de l'incidence des infections;
- 5) Augmentation de la fréquence des tumeurs (peut être un signe d'immunosuppression en l'absence d'une autre cause plausible, comme la génotoxicité, des effets hormonaux ou l'induction des enzymes hépatiques).

Toute variation de ces paramètres pourrait être un signe d'immunosuppression ou d'immunostimulation. De façon générale, la valeur des paramètres précédents est faible dans le cas d'une immunosuppression et élevée dans le cas d'une immunostimulation. Il ne s'agit cependant pas d'une règle absolue, les résultats pouvant être inversés dans certains cas. Comme c'est le cas lorsqu'on évalue le risque de toxicité pour d'autres systèmes ou appareils de l'organisme, l'évaluation de l'immunotoxicité doit tenir compte des éléments suivants :

- Signification statistique et biologique des variations,
- Gravité des effets,
- Relation dose-exposition,
- Maintien d'une marge de sécurité au-dessus de la dose clinique prévue,
- Durée de l'exposition,
- Nombre d'espèces et de paramètres touchés,
- Variations secondaires à d'autres facteurs (p. ex. stress; voir l'annexe, à la section 1.4),
- Mécanismes d'action et/ou cibles cellulaires possibles,
- Comparaison des doses qui entraînent de telles variations et de celles qui entraînent d'autres effets toxiques,
- Réversibilité des effets.

### **2.1.2 Propriétés pharmacologiques**

Si les propriétés pharmacologiques d'un composé à l'étude indiquent que ce dernier est susceptible d'avoir un effet sur la fonction immunitaire (p. ex. anti-inflammatoires), il faut envisager de réaliser des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires. On pourrait utiliser les résultats d'études pharmacologiques non cliniques sur l'aptitude d'un composé à agir sur le système immunitaire pour déterminer, selon la méthode du poids de la preuve, si des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires s'imposent.

### **2.1.3 Population de patients visée**

Il peut être nécessaire d'effectuer des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires si la majorité des patients à qui un médicament donné est destiné est immunodéprimée en raison d'un état pathologique ou d'un traitement concomitant.

### **2.1.4 Ressemblances structurelles**

Il faut également déterminer s'il y a lieu d'effectuer des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires dans le cas de composés dont la structure est semblable à celle de composés que l'on sait immunosuppresseurs.

### **2.1.5 Élimination des médicaments**

Si le composé et/ou ses métabolites demeurent présents à des concentrations élevées dans les cellules du système immunitaire, des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires devraient être envisagées.

### **2.1.6 Signes observés lors d'essais cliniques ou à la suite d'une utilisation clinique**

L'obtention d'un résultat clinique évoquant un effet immunotoxique chez les patients exposés à un médicament donné pourrait justifier la réalisation d'épreuves non cliniques supplémentaires d'immunotoxicité.

## **2.2 Examen du poids de la preuve**

Il faut procéder à un examen du poids de la preuve fondé sur l'information associée à tous les facteurs précédents, afin de déterminer si des aspects sont préoccupants. L'obtention d'un résultat suffisamment significatif à l'égard de l'un de ces facteurs devrait entraîner la réalisation d'épreuves d'immunotoxicité supplémentaires. L'obtention, à l'égard de deux ou de plusieurs facteurs, de résultats qui ne seraient pas suffisamment significatifs pris isolément pourrait aussi nécessiter la réalisation d'épreuves supplémentaires. Si le promoteur n'effectue pas ces épreuves supplémentaires, il doit se justifier.

## **3. ÉPREUVES D'IMMUNOTOXICITÉ SUPPLÉMENTAIRES - SÉLECTION ET ÉLABORATION**

### **3.1 Objectifs**

Si l'on obtient un résultat suffisamment préoccupant à l'égard d'un composé, des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires s'imposent pour vérifier le potentiel immunotoxique de ce dernier. De telles épreuves peuvent aider à déterminer le type de cellules touchées, la réversibilité des effets et le mécanisme d'action. Ce type d'information peut également permettre de mieux comprendre les risques potentiels et mener à la sélection de biomarqueurs en vue de la réalisation d'études cliniques.

### **3.2 Sélection des essais**

Si l'examen du poids de la preuve fait ressortir la nécessité d'effectuer des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires, un certain nombre d'essais peuvent être effectués. En présence de données évoquant un effet immunotoxique, le choix du type d'épreuves d'immunotoxicité supplémentaires à réaliser dépendra de la nature des modifications immunologiques observées et des préoccupations soulevées par la classe du composé. On recommande d'effectuer une étude de la fonction immunitaire, comme l'analyse de la réponse

anticorps T-dépendante. Si les cellules touchées dans une ETN sont d'un type qui n'intervient pas dans la réponse anticorps T-dépendante, on pourrait procéder à des analyses qui mesurent l'activité de ce type de cellules bien précis (voir l'annexe). Faute d'une cible définie, il est recommandé d'effectuer une étude de la fonction immunitaire, comme l'analyse de la réponse anticorps t-dépendante.

On peut en outre pratiquer l'immunophénotypage des populations de leucocytes, épreuve non fonctionnelle, pour identifier les populations de cellules touchées et éventuellement obtenir de possibles biomarqueurs cliniques.

### 3.3 Plan d'étude

Pour déterminer le degré d'immunotoxicité d'un médicament donné, le plan d'étude habituel chez les rongeurs consiste à soumettre les animaux à une exposition quotidienne pendant 28 jours consécutifs. Il existe également certaines variations de ce plan adaptées aux autres espèces. Dans les épreuves d'immunotoxicité supplémentaires, il faut utiliser, dans la mesure du possible, les mêmes espèces, souches, doses, durées d'exposition et voies d'exposition que dans les épreuves de toxicité normalisées ayant montré un effet indésirable sur le système immunitaire. Sauf dans le cas des primates non humains, il faut généralement utiliser des animaux des deux sexes; l'utilisation d'animaux d'un seul sexe doit être justifiée. La dose élevée doit être supérieure à la dose sans effet nocif observé (DSENO), mais inférieure à une dose entraînant des effets secondaires associés au stress (voir la section 1.4 de l'annexe). Il est recommandé d'utiliser différentes doses pour vérifier s'il existe des relations dose-effets et pour connaître la dose à laquelle on n'observe aucun effet immunotoxique.

### 3.4 ÉVALUATION DES RÉSULTATS DES ÉPREUVES D'IMMUNOTOXICITÉ SUPPLÉMENTAIRES ET DÉTERMINATION DE LA NÉCESSITÉ DE RÉALISER D'AUTRES ÉPREUVES

Il faut évaluer les résultats des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires afin de voir si l'on dispose de données suffisantes pour déterminer de manière raisonnable le risque d'immunotoxicité.

1. Les épreuves supplémentaires peuvent montrer qu'il n'y a aucun risque d'immunotoxicité, ce qui rendrait inutile la réalisation d'autres épreuves.
2. Les épreuves supplémentaires pourraient montrer un risque d'immunotoxicité sans toutefois fournir suffisamment de données pour étayer une décision raisonnable fondée sur les risques et les avantages. Dans un tel cas, la réalisation d'autres épreuves pourrait combler cette lacune.
3. Si l'analyse globale des risques et des avantages donne à penser que le risque d'immunotoxicité pourrait être acceptable et/ou qu'il pourrait faire l'objet d'un plan de

gestion des risques (voir la Directive tripartite harmonisée de l'ICH [E2E]<sup>2</sup>), il pourrait être inutile d'effectuer d'autres épreuves chez les animaux.

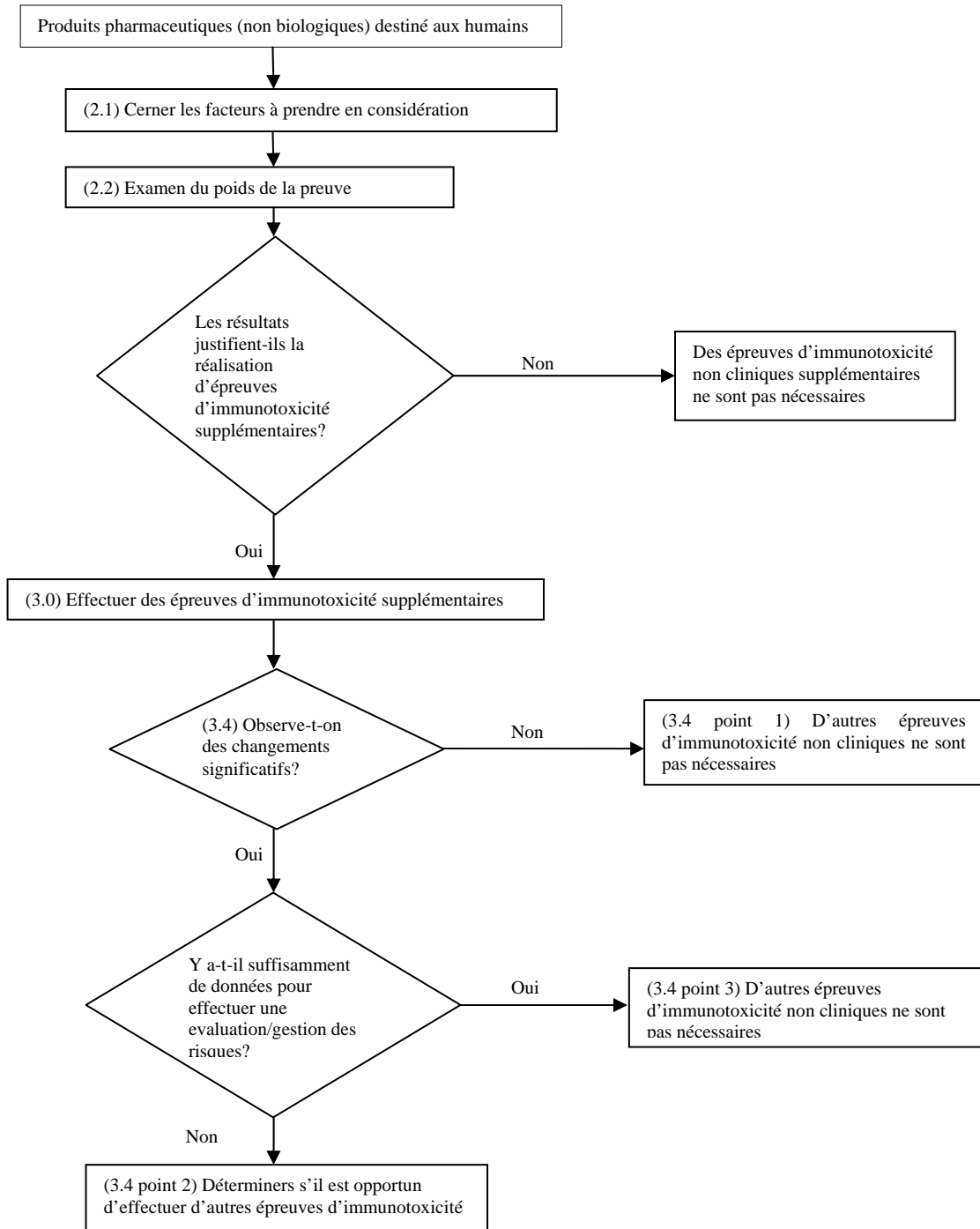
#### **4. MOMENT DE LA RÉALISATION DES ÉPREUVES D'IMMUNOTOXICITÉ PAR RAPPORT AUX ESSAIS CLINIQUES**

Si l'examen du poids de la preuve fait ressortir la nécessité d'effectuer des épreuves d'immunotoxicité supplémentaires, ces dernières devraient être terminées avant qu'un grand nombre de patients soient exposés au produit, comme dans le cas d'essais de phase III. Il sera ainsi possible, le cas échéant, d'intégrer la surveillance de paramètres immunitaires dans les études cliniques. Le choix du moment auquel il convient d'effectuer les épreuves d'immunotoxicité supplémentaires pourrait être fondé sur la nature de l'effet, sur le composé étudié et sur le type d'épreuves cliniques qu'il faudrait réaliser dans l'éventualité où l'on obtiendrait des résultats positifs aux épreuves supplémentaires. Si la population de patients cible est immunodéprimée, les épreuves d'immunotoxicité peuvent être réalisés à une étape plus précoce de la mise au point du médicament.

#### **5. RÉFÉRENCES**

1. Directive tripartite harmonisée de l'ICH (S6) : *Évaluation au stade préclinique de la sécurité de produits pharmaceutiques issus de la biotechnologie*
2. Directive tripartite harmonisée de l'ICH (E2E) : *Pharmacovigilance Planning*

Figure 1 : Évaluation de l'immunotoxicité recommandée - Diagramme décisionnel



## ANNEXE : MÉTHODES D'ÉVALUATION DE L'IMMUNOTOXICITÉ

### 1. Épreuves de toxicité normalisées

Le tableau suivant présente les paramètres à évaluer dans des épreuves de toxicité normalisées afin de déceler des signes d'immunotoxicité. On trouvera une description plus détaillée de ces paramètres (à l'exception de l'« hématologie » et de la « chimie clinique ») et des méthodes de prélèvement d'échantillons et d'examen de coupes de tissus dans les documents d'associations professionnelles de pathologie toxicologique.

Paramètres	Composants
Hématologie	Numération leucocytaire et formule leucocytaire (valeur absolue)
Chimie clinique	Globulinémie <sup>1</sup> et rapport albumine/globuline
Pathologie macroscopique	Organes/tissus lymphoïdes
Poids des organes	Thymus, rate (facultatif : ganglions lymphatiques)
Histologie	Thymus, rate, ganglion lymphatique de drainage et au moins un autre ganglion lymphatique, moelle osseuse <sup>2</sup> , plaques de Peyer <sup>3</sup> , BALT <sup>4</sup> , NALT <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Une altération inexplicée de la globulinémie pourrait justifier un dosage des immunoglobulines.

<sup>2</sup> Une altération inexplicée des lignées cellulaires du sang périphérique ou des observations histopathologiques pourrait justifier l'examen cytologique de la moelle osseuse.

<sup>3</sup> Administration par voie orale seulement.

<sup>4</sup> Administration par inhalation ou par voie nasale seulement. BALT : tissu lymphoïde associé aux bronches. NALT : tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale.

#### 1.1 Hématologie et chimie clinique

Il est recommandé d'effectuer une numération leucocytaire et une formule leucocytaire (exprimée en valeur absolue) pour évaluer l'immunotoxicité du produit. D'autres facteurs (p. ex. hépatotoxicité, néphrotoxicité) doivent être pris en compte dans l'analyse des variations de la globulinémie. Une variation de la globulinémie peut indiquer une variation de l'immunoglobulinémie. Bien que le taux sérique d'immunoglobulines soit un indicateur peu sensible de l'immunosuppression, une variation de ce taux pourrait, dans certaines situations, permettre de mieux cerner les populations de cellules cibles et de mieux comprendre les mécanismes d'action.

## 1.2 Pathologie macroscopique et poids des organes

Il faut rechercher la présence d'altérations macroscopiques dans tous les tissus lymphoïdes à l'autopsie. Un tel examen pourrait cependant se révéler plus difficile dans le cas des plaques de Peyer chez les rongeurs, en raison de leur petite taille. Il faut consigner le poids de la rate et du thymus. Afin de réduire au minimum la variabilité du poids de la rate chez les chiens et les singes, il est recommandé de saigner à blanc les animaux à l'autopsie. L'atrophie progressive du thymus avec l'âge peut rendre difficile la détermination du poids exact de l'organe.

## 1.3 Histologie

La présence d'altérations histopathologiques dans la rate ou le thymus doit être interprétée comme un signe d'immunotoxicité généralisée. Il faut examiner les tissus lymphoïdes qui drainent la région où le médicament est administré ou qui sont en contact avec celle-ci, car ce sont ces tissus qui sont exposés à la plus forte concentration du médicament. Il s'agit notamment des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques mésentériques dans le cas des médicaments administrés par voie orale, du tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) dans le cas des médicaments administrés par inhalation, du tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT) dans le cas des médicaments administrés par inhalation ou par voie nasale (dans la mesure du possible) et des ganglions lymphatiques régionaux de drainage les plus rapprochés lorsque les médicaments sont administrés par voie dermique, intramusculaire, intradermique, intrathécale ou sous-cutanée. Le choix du ganglion lymphatique de drainage et du ganglion lymphatique supplémentaire à prélever devrait être laissé au promoteur. Dans le cas de médicaments administrés par voie intraveineuse, on peut considérer la rate comme étant le tissu lymphoïde de drainage.

Il est recommandé d'effectuer une description « semi-quantitative » des altérations observées dans les compartiments des tissus lymphoïdes au moment de consigner ces altérations associées au traitement et de les signaler.

## 1.4 Interprétation des altérations associées au stress

Dans le cas d'épreuves de toxicité normalisées, l'administration de doses voisines de la dose maximale tolérée ou égales à celle-ci peut altérer le fonctionnement du système immunitaire en raison du stress qu'elle peut occasionner (p. ex. activité pharmacodynamique exagérée). Ces effets pourraient être provoqués par une augmentation de la libération de corticostérone, de cortisol ou d'autres médiateurs. Parmi les altérations liées au stress les plus fréquentes figurent une augmentation du nombre de neutrophiles circulants, une diminution du nombre de lymphocytes circulants, une diminution du poids du thymus, une diminution de la richesse en éléments cellulaires du cortex thymique et l'apparition d'altérations histopathologiques connexes, ainsi qu'une modification de la richesse en éléments cellulaires de la rate et des ganglions lymphatiques. On peut également observer une augmentation du poids de la glande



surrénale et/ou des signes histologiques d'une hyperplasie du cortex surrénal. On attribue trop souvent au stress la diminution du poids du thymus en présence de signes cliniques tels qu'une diminution du poids corporel et du degré d'activité physique. Ces signes ne devraient pas, à eux seuls, être considérés comme une preuve d'immunotoxicité liée au stress. Les signes de stress doivent être inéquivoques pour justifier la non-réalisation d'épreuves d'immunotoxicité supplémentaires.

## **2. Épreuves d'immunotoxicité supplémentaires**

### **2.1 Validation et caractérisation des essais**

De façon générale, il faut choisir une épreuve d'immunotoxicité largement utilisée et dont la sensibilité et la spécificité à l'égard d'agents immunosuppresseurs connus ont été établies. Cependant, dans certaines situations, il se peut que l'épreuve n'ait pas fait l'objet d'une validation approfondie et/ou qu'elle ne soit pas largement utilisée. Dans ces situations, il faut présenter une justification scientifique/mécanistique de l'utilisation de l'essai et, dans la mesure du possible, intégrer des témoins positifs appropriés.

Les résultats des épreuves d'immunotoxicité peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. Dans la plupart des cas, ces différences n'altèrent aucunement l'efficacité avec laquelle l'essai permet de déterminer le degré d'immunotoxicité d'un produit. Cependant, pour s'assurer que les essais sont réalisés correctement et que les laboratoires sont suffisamment compétents, il faut contrôler plusieurs paramètres standard de validation technique, comme la précision intra-essai et inter-essai, la précision d'un technicien à l'autre, les limites de dosage, la région linéaire de la courbe de dosage et la stabilité des échantillons. Il faut, de plus, déterminer le degré de sensibilité de l'essai à l'égard des agents immunosuppresseurs connus. À des fins d'évaluation de la compétence, il est recommandé que chaque laboratoire analyse un témoin positif de façon périodique ou en même temps que le composé à l'étude, sauf lorsque les épreuves font intervenir des primates non humains. Si les techniques d'immunophénotypage sont adéquatement validées, on pourrait se dispenser d'utiliser des témoins positifs dans chaque épreuve.

Les épreuves d'immunotoxicité doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire; cependant, il est admis que certaines épreuves spécialisées, comme les suivantes, pourraient ne pas être entièrement conformes à ces pratiques.

### **2.2 Analyse de la réponse anticorps T-dépendante**

Cette épreuve doit être effectuée à l'aide d'un antigène T-dépendant reconnu (p. ex. globules rouges de mouton, hémocyanine de patelle) qui entraîne une importante réponse anticorps. Il faut démontrer que le paramètre sélectionné est celui qui convient le mieux à l'épreuve et à l'espèce choisies.

Il ne faut pas utiliser d'adjuvants avec des antigènes destinés à une immunisation sans justification; toutefois, il pourrait être acceptable d'utiliser de l'alun chez les primates non humains seulement. La réponse anticorps T-dépendante peut varier selon la souche, particulièrement chez les souris. Chez les rats exogames, il peut y avoir une grande variabilité entre les membres d'un même groupe. On peut utiliser des souches de rats pures si l'on fournit suffisamment de données sur l'exposition pour établir un lien avec la souche utilisée dans l'ETN.

Le dosage des anticorps peut être effectué par la technique ELISA ou par toute autre méthode de dosage immunologique. L'un des avantages de cette technique par rapport à l'analyse de la réponse des cellules productrices d'anticorps est la possibilité de prélever les échantillons séquentiellement au cours de l'épreuve. Dans les épreuves faisant intervenir des singes, ce mode de prélèvement peut se révéler important en raison de la grande variabilité de la cinétique de la réponse d'un animal à l'autre. Dans de telles épreuves, les données peuvent être présentées comme la somme des réponses anticorps mesurées à partir d'échantillons prélevés au cours d'une période donnée (p. ex. l'aire sous la courbe).

Lorsqu'on utilise des antigènes de globules rouges de mouton pour effectuer un dosage par la technique ELISA, l'étape de la préparation de l'antigène de capture dont on enduit les plaques est cruciale. On peut utiliser comme antigène de capture des érythrocytes fixés ou des préparations membranaires. Les résultats du test ELISA doivent être exprimés sous forme de concentration ou de titre; il n'est pas recommandé de les exprimer en densité optique.

### **2.3 Immunophénotypage**

L'immunophénotypage consiste à identifier et/ou à dénombrer les sous-groupes de leucocytes à l'aide d'anticorps, habituellement par cytométrie de flux ou par immunohistochimie.

La cytométrie de flux, lorsqu'elle est utilisée pour dénombrer des populations de cellules, ne constitue pas un essai fonctionnel. Cependant, on peut l'utiliser pour mesurer la réponse immunitaire spécifique des lymphocytes à l'égard d'antigènes précis. Les données obtenues à partir du sang périphérique peuvent servir à établir un lien avec les données d'études cliniques dans lesquelles on analyse également les leucocytes du sang périphérique. Il est recommandé d'utiliser le nombre absolu de sous-groupes de lymphocytes et des pourcentages pour évaluer les variations liées à l'exposition.

L'un des avantages de l'immunohistochimie par rapport à la cytométrie de flux est qu'elle permet d'analyser rétrospectivement les tissus utilisés dans les épreuves de toxicité normalisées si l'on a noté des signes d'immunotoxicité. Elle permet également d'observer des altérations à l'égard de certains types de cellules dans des compartiments donnés de ces tissus. Chez certaines espèces, des marqueurs lymphocytaires sont sensibles au formaldéhyde et ne peuvent être localisés que dans des tissus surgelés ou fixés à l'aide d'autres agents. Il est cependant beaucoup

plus difficile de dénombrer les leucocytes et d'évaluer l'intensité de la coloration par immunohistochimie.

Lorsqu'on a recours à l'immunophénotypage pour caractériser ou identifier des altérations au sein de populations de leucocytes, c'est la nature des altérations observées qui détermine le choix des organes lymphoïdes à examiner et/ou la décision de prélever du sang périphérique. On peut facilement intégrer l'immunophénotypage dans les épreuves de toxicité normalisées à doses répétées et suivre les variations pendant le dosage et les périodes sans exposition (période de rétablissement).

#### **2.4 Analyse de l'activité des cellules NK**

On peut analyser l'activité des cellules NK si l'immunophénotypage révèle une modification de leur nombre ou si les épreuves de toxicité normalisées montrent qu'il y a augmentation du taux d'infection virale ou en raison d'autres facteurs. De façon générale, l'analyse des cellules NK se fait *ex vivo*, c'est-à-dire que les tissus (p. ex. la rate) ou le sang sont prélevés chez des animaux qui ont été exposés au composé à l'étude. Les préparations cellulaires sont incubées avec des cellules cibles marquées au  $^{51}\text{Cr}$ . On peut utiliser de nouvelles méthodes faisant appel à des marqueurs non radioactifs si elles ont été validées adéquatement. Il faut évaluer un rapport effecteur-cellule cible différent pour chaque essai afin d'obtenir un degré suffisant de cytotoxicité et de pouvoir tracer une courbe.

#### **2.5 Études de la résistance de l'hôte**

Les études de la résistance de l'hôte consistent à provoquer, à l'aide de différentes concentrations d'un agent pathogène (bactérie, champignon, virus, parasite) ou de cellules tumorales, des groupes de souris ou de rats exposés à diverses doses du composé à l'essai. On compare alors l'infectivité des agents pathogènes ou la charge tumorale chez les animaux exposés à l'excipient et ceux exposés au composé à l'essai afin de déterminer si ce dernier peut modifier la résistance de l'hôte. Il existe divers modèles faisant intervenir tout un éventail d'agents pathogènes, comme *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, le virus de la grippe, le cytomégalovirus, *Plasmodium yoelii* et *Trichinella spiralis*; quant aux modèles murins de résistance aux tumeurs, ils font intervenir la lignée de cellules de mélanome B16F10 et la lignée de cellules de sarcome PYB6.

Les études de la résistance de l'hôte peuvent fournir de l'information sur la sensibilité de l'organisme à diverses catégories d'agents infectieux ou de cellules tumorales et peuvent avoir une incidence sur le plan de gestion des risques. De plus, ces études peuvent jouer un rôle important dans l'identification ou la confirmation du type de cellules altéré par le composé à l'étude. Qui plus est, ces études font intervenir les mécanismes de l'immunité innée, pour lesquels des épreuves spécifiques de fonction immunitaire n'ont pas été élaborées. Lorsqu'ils effectuent des études de la résistance de l'hôte, les chercheurs doivent faire très attention aux

effets directs ou indirects (non immunitaires) que peut avoir le composé à l'étude sur la croissance et la pathogénicité des microorganismes ou des cellules tumorales. Par exemple, les composés qui inhibent la prolifération de certaines cellules tumorales peuvent sembler accroître la résistance de l'hôte. Il est recommandé d'effectuer une épreuve *in vitro* afin de mesurer les effets directs sur les microorganismes.

## **2.6 Épreuves fonctionnelles à l'égard des macrophages et des neutrophiles**

Des épreuves fonctionnelles *in vitro* à l'égard des macrophages et des neutrophiles (activités de phagocytose, de stimulation du métabolisme oxydatif, de chimiotaxie et de cytolyse) ont été publiées pour plusieurs espèces. Ces épreuves portent sur l'activité des macrophages et des neutrophiles exposés *in vitro* au composé à l'étude ou prélevés chez des animaux exposés au composé à l'étude (*ex vivo*). Il est également possible d'effectuer une épreuve *in vivo* pour évaluer l'effet sur l'aptitude des cellules réticuloendothéliales à phagocyter des cibles marquées d'un indicateur radioactif ou fluorescent.

## **2.7 Épreuves visant l'immunité à médiation cellulaire**

Les épreuves visant à mesurer l'immunité à médiation cellulaire sont relativement récentes en comparaison de celles utilisées pour évaluer la réponse anticorps. Il s'agit d'épreuves réalisées *in vivo* dans lesquelles on effectue une sensibilisation à l'aide d'antigènes, afin de déterminer la mesure dans laquelle les médicaments peuvent moduler la réponse immunitaire après provocation. Des cas de réaction d'hypersensibilité retardée chez les souris et les rats ont été signalés après immunisation à l'aide de protéines et provocation. On a exploré l'utilisation de modèles murins faisant intervenir des allergènes de contact, mais ces modèles n'ont pas été suffisamment validés ni utilisés. Chez les souris, on peut provoquer l'activité des cellules T cytotoxiques à l'aide d'un virus, d'une lignée de cellules tumorales ou d'une allogreffe. On a également fait état de cas de réaction d'hypersensibilité retardée chez le singe, mais il s'est révélé très difficile de reproduire ces réactions de façon systématique. De plus, il est essentiel de ne pas confondre une réaction d'hypersensibilité retardée avec le phénomène d'Arthus, médié par les anticorps et le complément.