

COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS



Organisation des Nations
Unies pour l'alimentation
et l'agriculture



Organisation
mondiale de la Santé

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy - Tel: (+39) 06 57051 - Fax: (+39) 06 5705 4593 - E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.net

Point 4 de l'ordre du jour

CAC/33 CRD/02

PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS

Trente-troisième session

Genève (Suisse), 5 - 9 juillet 2010

EXTRAIT DES MONOGRAPHIES FAO/JECFA N°9 - VERSION DE PRÉPUBLICATION ADDENDUM À LA MONOGRAPHIE SUR LES RÉSIDUS DU CHLORHYDRATE DE RACTOPAMINE

Généralités

Le résumé et l'analyse ainsi que la conclusion et les recommandations de l'évaluation du JECFA des études sur l'élimination des résidus de la ractopamine dans les tissus porcins réalisées par la République populaire de Chine, figurent dans l'appendice au présent document. L'appendice est un extrait des Monographies FAO/JECFA n°9 – version de prépublication de l'Addendum à la monographie des résidus du chlorhydrate de ractopamine (en anglais).

L'évaluation constitue un addendum aux monographies élaborées par le JECFA (quarantième, soixante-deuxième et soixante-sixième sessions) et publiées dans la série Études FAO Alimentation et Nutrition 41/5, 41/16 et Monographies FAO/JECFA n°2, respectivement. La prépublication des Monographies FAO/JECFA n°9 est disponible en ligne sur le site web FAO JECFA à l'adresse suivante: <http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/JECFAMonographs9.pdf>.

Appendice**EXTRAIT DES MONOGRAPHIES FAO/JECFA N°9 – VERSION DE PRÉPUBLICATION DE L'ADDENDUM À LA MONOGRAPHIE DES RÉSIDUS DU CHLORHYDRATE DE RACTOPAMINE****Résumé et analyse****Généralités**

L'addendum à la monographie sur les résidus du chlorhydrate de ractopamine figurant dans le présent volume des Monographies FAO JECFA sur les résidus et l'exposition à ces résidus, ainsi que les déclarations concernant les études des résidus du ractopamine dans les tissus porcins, ont été rédigés par les experts invités pour cette réunion électronique du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) durant la période allant de janvier à mai 2010. Le Comité était chargé d'évaluer trois études sur l'élimination des résidus de ractopamine dans les tissus porcins réalisées par la République populaire de Chine, de prendre en considération les autres études pertinentes évaluées précédemment dans ce contexte par le Comité, de formuler des recommandations quant aux conséquences que les informations fournies dans ces trois études étaient susceptibles d'avoir sur les LMR recommandées pour la ractopamine et d'examiner les autres problèmes scientifiques découlant de l'évaluation de ces études. L'étude supplémentaire reçue en mai 2010 a fait l'objet d'un examen distinct du fait de sa soumission tardive.

Cette demande émanait de la Commission du Codex Alimentarius (trente-deuxième session), qui invitait la FAO et l'OMS à examiner les trois études de résidus, réalisées par la République populaire de Chine, sur des porcs auxquels un prémélange de chlorhydrate de ractopamine était administré. Ces études sur l'élimination des résidus de ractopamine étaient menées sur trois races porcines différentes et dans trois laboratoires nationaux différents situés à Wuhan, Guangzhou et Beijing. La délégation de la République populaire de Chine avait exprimé ses inquiétudes devant la Commission du Codex Alimentarius (trente-deuxième session) sur les concentrations de résidus de ractopamine dans le poumon, l'estomac, le cœur, le gros intestin et l'intestin grêle ainsi que dans les tissus pour lesquels des LMR étaient proposées (muscle, foie, rein et graisse), en particulier aux premiers points de prélèvement après l'arrêt de l'administration des aliments médicamenteux.

Description des trois nouvelles études sur les résidus chez le porc

L'étude de Wuhan portait sur 40 porcs blancs de Hubei. Tous les porcs recevaient une dose journalière d'environ 20 mg de chlorhydrate de ractopamine par kg d'aliment médicamenteux pendant 30 jours. La consommation d'aliments était d'environ 2 kg/animal/jour. Les animaux étaient abattus 6, 12 heures et 1, 2, 3, 5, 7 et 9 jours après l'arrêt de l'administration d'aliments médicamenteux. Le muscle, le foie, le rein, le cœur, le poumon, l'estomac, le gros intestin et l'intestin grêle étaient collectés et analysés. Les concentrations de résidus de ractopamine dans le foie, le rein, le poumon et l'intestin grêle étaient plus élevées que dans les autres tissus. Les concentrations de résidus étaient plus fortes dans le poumon que dans le foie et le rein, et étaient détectées jusqu'au neuvième jour après suppression de l'aliment médicamenteux.

L'étude de Beijing utilisait un croisement binaire Landrace x Large Yorkshire. Les animaux recevaient une dose journalière d'environ 20 mg de chlorhydrate de ractopamine par kg d'aliment médicamenteux pendant 30 jours. La consommation moyenne d'aliments était de 2,18 kg/animal/jour. Des échantillons de muscle, foie, rein, cœur, poumon, estomac, gros intestin et intestin grêle étaient prélevés sur tous les animaux traités et les animaux témoins à 12 heures, 1, 2, 3, 5, 7 et 11 jours. Les concentrations de résidus de ractopamine étaient supérieures à la limite de quantification ($0,5 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) dans tous les tissus prélevés 11 jours après le traitement sauf dans le muscle.

L'étude de Guangzhou utilisait 30 porcs tachetés à petites oreilles. Tous les porcs recevaient une dose journalière d'environ 20 mg de chlorhydrate de ractopamine par kg d'aliment médicamenteux pendant 30 jours. La consommation moyenne d'aliments était de 1,63 kg/animal/jour. Les animaux étaient abattus 6, 12 heures et 1, 2, 3 et 5 jours après traitement. Des échantillons de muscle, foie, rein, cœur, poumon, estomac, gros intestin et intestin grêle étaient prélevés sur tous les animaux traités et les animaux témoins. La distribution de la ractopamine montrait la sélectivité tissulaire chez le porc, les plus fortes concentrations à 12 heures étaient observées dans le rein, suivi par le poumon, et ensuite par ordre décroissant l'estomac, le

foie, l'intestin grêle, le gros intestin et le muscle. Les résidus de ractopamine dans le poumon s'éliminaient lentement.

Autre étude soumise en mai 2010

L'autre étude utilisait 25 porcs Duroc × large White × Landrace. Tous les porcs recevaient une dose journalière d'environ 20 mg/kg de chlorhydrate de ractopamine pendant 30 jours. La consommation moyenne d'aliments était de 2,61 kg/animal/jour, soit plus élevée que dans les trois autres études. Les animaux étaient abattus 6, 24, 48 et 72 heures après traitement. Des échantillons de muscle, foie, rein, graisse, poumon, cœur, estomac, gros intestin et intestin grêle étaient prélevés. L'analyse était effectuée avec et sans digestion enzymatique des échantillons de tissus avant extraction et purification. Les concentrations de résidus déterminées en utilisant l'étape enzymatique sont toutes supérieures à celles déterminées sans étape enzymatique sauf pour le tissu pulmonaire où le rapport était approximativement de 1, c'est-à-dire les résidus dans le tissu pulmonaire consistaient essentiellement en ractopamine libre. Pour ce qui concerne les tissus de l'estomac, du gros intestin et de l'intestin grêle, les rapports se situaient entre 1,09 et 1,20. Les coefficients de variation (CV) élevés pour les résultats intra- et interlaboratoires montrent que l'étape enzymatique pose des problèmes concernant la reproductibilité pour les tissus de graisse, rein et foie, en conformité avec les observations formulées pour les données de résidus pour ces tissus dans les trois autres études. Les niveaux de résidus dans tous les échantillons de tissus analysés en utilisant l'étape d'hydrolyse enzymatique étaient du même ordre de grandeur que dans les autres études. Aucune comparaison directe des évaluations de l'exposition alimentaire n'a été effectuée avec les autres études étant donné qu'aucun échantillon n'a été prélevé à 12 heures de l'arrêt du traitement dans cette nouvelle étude.

Comparaison des nouvelles données avec les données évaluées précédemment

Les trois nouvelles études ont fait l'objet d'une analyse détaillée aux fins de comparaison avec les études qui avaient été évaluées précédemment et utilisées pour recommander les LMR. Des différences ont été relevées dans les protocoles et méthodologies utilisés pour déterminer les résidus de ractopamine ainsi que dans la détermination des résidus de ractopamine dans les tissus des organes autres que le foie et le rein. Une analyse approfondie a été réalisée pour estimer la relation existant entre les résidus de ractopamine analysés dans les nouvelles études utilisant l'étape d'hydrolyse enzymatique et ceux déterminés dans les études évaluées précédemment par le Comité. L'évaluation précédente employait le rapport du résidu marqueur aux résidus totaux déterminés sans hydrolyse enzymatique. Les informations concernant les métabolites de ractopamine (A, B, C et D représentant les conjugués ractopamine connus) provenant des études de la ractopamine examinées précédemment ont été utilisées à ce propos.

Dans cette analyse, le rapport entre les résidus de ractopamine libre dans le rein et dans le foie et les résidus totaux était de 0,318 et 0,153, respectivement, estimés à partir des données provenant des études évaluées précédemment par le Comité. Les valeurs les plus comparables du marqueur par rapport aux résidus totaux pour les données issues des trois nouvelles études étaient estimées à 0,76 et 0,565, respectivement, sur la base des données correspondant à un prélèvement effectué 12 heures après arrêt du traitement. Ces valeurs estimatives étaient calculées à l'aide des données sur le métabolisme des résidus provenant des évaluations précédentes. Le délai de 12 heures était choisi car seuls les résultats d'études conçues de façon analogue peuvent être comparés pour obtenir des résultats fiables. Il est donc a priori exclu de comparer les études du dossier initial avec les nouvelles études à tout autre délai que 12 heures. Ces rapports étaient appliqués pour estimer l'exposition par voie alimentaire.

Les données cinétiques sur les études de l'élimination des résidus ont fait l'objet d'une analyse détaillée. À sa soixante-sixième réunion, le Comité a conclu qu'il serait possible de regrouper les données des études présentées par le commanditaire à ses soixante-deuxième et soixante-sixième réunions. On trouvera aux figures 7 et 8 des diagrammes à échelle semi-logarithmique de l'élimination du résidu marqueur dans le foie et le rein. À partir de cette analyse, on a calculé une droite de régression linéaire et la limite supérieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95 pour cent au dessus du 95^e percentile ("limite de tolérance 95/95"). Cette limite est la valeur choisie en général pour les LMR recommandées par le Comité. Ces données ont été comparées avec les résultats des trois nouvelles études. L'analyse montre parfois des différences notables entre les résultats de ces trois études, notamment en ce qui concerne les concentrations maximales observées à des temps de prélèvement rapprochés, la pente d'élimination, la variabilité des données obtenues pour les différents animaux et le nombre de phases d'élimination. Bien que des diagrammes d'élimination des résidus comparables aient pu être élaborés, la variabilité, mesurée en tant que

coefficients de variation (CV) sur les analyses répétées, montrait de grandes différences entre les trois nouvelles études. Les CV sur les analyses répétées étaient les plus bas pour l'analyse de Beijing et les plus élevés pour celle de Wuhan.

Les valeurs de concentration provenant des trois études étaient utilisées, après transformation logarithmique, pour l'analyse de régression linéaire. Ce modèle donnait un ajustement acceptable du modèle linéaire à la plupart des séries de données sauf les données décrivant la cinétique dans le tissu pulmonaire. Les paramètres de la régression linéaire étaient utilisés pour estimer les "limites de tolérance 95/95". Le rapport entre la limite de tolérance et les concentrations médianes de résidus servait d'indicateur de la variabilité des résultats obtenus pour les groupes d'animaux utilisés dans les études.

La variabilité des résultats était la plus élevée dans l'étude de Guangzhou. Les facteurs qui peuvent expliquer en partie la variabilité sont notamment les poids corporels initiaux, qui étaient nettement plus élevés dans cette étude que dans les deux autres (les poids corporels en fin de traitement ne sont pas communiqués dans l'étude de Guangzhou et les informations sur l'apport alimentaire n'étaient pas fournies pour un groupe de traitement); la variabilité des gains de poids corporel était également plus forte dans cette étude. Le rapport aliments/gain de poids corporel était aussi le plus faible dans l'étude de Guangzhou. Ce résultat correspond au fait que les concentrations de résidus observées dans l'étude de Guangzhou sont dans l'ensemble les plus faibles des trois études.

On a essayé de recalculer certains résultats des trois nouvelles études en équivalents de résidu marqueur provenant des évaluations du Comité (soixante-deuxième et soixante-sixième réunions) (voir tableau 4). Le Comité a reconnu que cette méthode comportait des incertitudes inhérentes inconnues et pouvant être importantes. Toutefois, ces calculs aident à souligner quelques unes des différences majeures qui existent entre les trois nouvelles études et les études initiales évaluées par le Comité. Les calculs n'ont été possibles que pour le foie et le rein car il n'existait pas de données comparables pour les autres tissus. L'analyse laisse penser que les concentrations de résidus dans le foie, exprimées en tant que résidu marqueur, comme défini par le Comité à sa soixante-sixième réunion, étaient semblables dans toutes les études pour la médiane et les "limites de tolérance 95/95". En revanche, les concentrations de résidus dans le rein étaient beaucoup plus élevées dans les trois nouvelles études. Une variabilité très importante a aussi été constatée dans ces données, comme l'indique la distance entre la médiane et les limites de tolérance.

Estimations de l'exposition par voie alimentaire

Pour ce qui concerne l'évaluation de l'ingestion par voie alimentaire, seule l'étude de Wuhan fournit des données cinétiques de résidus pour tous les tissus du régime modèle employé par le Comité. De plus, les concentrations de résidus observées dans le muscle, le foie et le rein étaient plus élevées que dans les deux autres nouvelles études. En utilisant les données de l'étude de Wuhan on obtiendrait les estimations de l'ingestion les plus élevées. Les concentrations prévues 12 heures après la fin du traitement ont été utilisées, ce délai étant le seul pour lequel des données comparables sont fournies pour le rapport (parent + conjugués)/résidu total connu découlant des études du premier dossier. Les informations disponibles sont suffisantes pour l'interpolation de toutes les données de concentration ou de tous les rapports marqueur/résidu total pour ce point dans le temps. Le délai de 12 heures est donc le seul pour lequel il était possible de comparer toutes les séries de données.

L'analyse détaillée de toutes les données suggère que les concentrations du résidu total dans le muscle et la graisse sont approximativement de la même grandeur que les concentrations du composé d'origine et du résidu marqueur mesurés dans l'étude de Wuhan. En conséquence, lorsque les délais avant prélèvement sont courts, le seul résidu important dans le muscle et la graisse est la ractopamine d'origine. Le facteur proposé pour le rapport du marqueur au résidu total est donc établi à 1. Pour la peau, il n'existe pratiquement pas de données permettant d'estimer le rapport du résidu marqueur au résidu total. La contribution des résidus dans la peau à l'ingestion totale est cependant très faible. En conséquence, le choix du facteur à utiliser est, dans la limite du raisonnable, peu important. Pour cette estimation, le Comité a utilisé un facteur de 1.

Pour le foie et le rein, l'étude ABC-0369 évaluée par le Comité à ses soixante-deuxième et soixante-sixième réunions, constitue la base de données pertinentes pour les métabolites des résidus de ractopamine. Le Comité supposait que seuls les métabolites A, B, C et D (conjugués de ractopamine) seraient hydrolysés de manière enzymatique pour produire la ractopamine et que les autres résidus endogènes étaient tous aussi préoccupants sur le plan toxicologique. Avec cette démarche prudente, le rapport du résidu marqueur

équivalent au résidu total provenant des nouvelles études serait 0,565 pour le foie et 0,760 pour le rein (voir tableau 4), correspondant aux facteurs de conversion de 1,770 pour le foie et de 1,316 pour le rein.

Avec les facteurs ci-dessus, l'apport journalier estimatif (utilisant les concentrations médianes des résidus) a été calculé sur la base de la nouvelle étude qui montrait les plus fortes concentrations de résidu marqueur, c'est-à-dire l'étude de Wuhan, et des facteurs de conversion les plus prudents calculés à partir des études du dossier initial. Avec ces facteurs de conversion, l'apport journalier estimatif en utilisant le muscle, le foie, le rein et la graisse est de 30,8 µg; en utilisant le muscle, le foie, le rein et la peau, il est de 31,2 µg. Ces deux valeurs sont très inférieures à la limite supérieure de la DJA (60 µg par jour).

Une modélisation et simulation a été effectuée pour estimer la robustesse des calculs utilisant le régime alimentaire modélisé et un régime avec une consommation accrue de foie et de porc. Des apports modélisés pour une durée de vie de 80 ans (soit 29 220 jours en 80 ans), dans l'hypothèse d'une consommation journalière de 300 g de muscle, 100 g de foie, 50 g de rein et 50 g de graisse ont été simulés. Pour chaque tissu, des valeurs aléatoires log-normales ont été générées pour un délai d'attente de 12 heures et se situant dans une fourchette numérique allant de la valeur prévue par la droite de régression des concentrations tissulaires *plus ou moins quatre fois* la variance résiduelle à la même variance résiduelle prévue. En utilisant les données de l'étude de Wuhan et le régime modélisé normal, 1,2 à 1,8 % des résultats dépassent en général la DJA, les résultats les plus élevés se situant aux alentours de 1,5 fois la limite supérieure de la DJA. Si l'on remplaçait les 100 g de foie et 50 g de rein du régime modélisé par 250 g de foie, sur la base des données de consommation de l'enquête chinoise de 2002 sur la Situation de la nutrition, de l'alimentation et de la santé fournies par le Centre de lutte contre les maladies en Chine, la distribution se déplaçait légèrement vers des valeurs d'apports plus élevés, avec 8,3 à 8,8 pour cent au-dessus de la limite supérieure de la DJA. Si l'on remplaçait les 100 g de foie et 50 g de rein par 200 g de rein, la distribution se déplaçait encore plus vers les valeurs d'apport plus élevées; 50,6 à 51,7 pour cent de ces valeurs dépasseraient la limite supérieure de la DJA.

Le Comité reconnaît que la consommation de tissu pulmonaire est une question spécifique qui n'a pas été traitée dans d'autres évaluations de résidus. Il n'existe pas de valeur consensuelle internationale pour estimer une consommation appropriée de tissu pulmonaire. De plus, il n'y a pas de données permettant de calculer des facteurs de conversion pour les concentrations du marqueur par rapport au résidu total pour la ractopamine dans le tissu pulmonaire. Il a été noté que l'évaluation générale des trois nouvelles études a montré une grande variabilité des résidus dans le tissu pulmonaire (l'étude de Guangzhou présente la plus forte variabilité des 27 séries de données fournies pour les différents tissus dans les trois études). En conséquence, dans les expériences de modélisation comme celles décrites plus haut, si l'on remplace le foie et le rein par 300 g de poumon et qu'on utilise des facteurs de conversion de 1 pour le rapport entre le résidu-marqueur et le résidu total, la dose journalière estimée dépasse la limite supérieure de la DJA pour les études de Wuhan et de Beijing. La dose journalière estimée pour l'étude de Guangzhou resterait nettement en dessous de la limite supérieure de la DJA.

Méthodes d'analyse

La méthode d'analyse utilisée dans les trois nouvelles études comprenait une étape où les échantillons de tissu étaient hydrolysés par un mélange de β -glucuronidase et d'arylsulfatase. L'échantillon hydrolysé était ensuite extrait par l'acétate d'éthyle-25 pour cent hydroxyde d'ammonium (95-5), purifié avec extraction en phase solide et analysé par couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse tandem (CL/SM-SM) utilisant comme étalon standard le chlorhydrate de ractopamine marqué au deutérium (D6) ou la ractopamine marquée au tri-deutérium (D3). La limite de quantification (LQ) indiquée pour cette méthode était 0,5 µg/kg⁻¹; la limite de détection (LD) était 0,2 µg/kg⁻¹. Cette procédure d'analyse pour la quantification des résidus de ractopamine est différente des méthodes prises en compte par le Comité dans les évaluations précédentes, où l'hydrolyse enzymatique n'était pas utilisée dans la détermination analytique des résidus de ractopamine.

La méthode d'analyse appliquée dans les études chinoises est considérée comme adaptée à l'objectif. Elle repose sur l'emploi de la dilution isotopique (étalons internes deutérés) et CL/SM-SM (séparation en phase inversée, ionisation par électrospray et acquisition de signaux dans le mode de contrôle de réaction choisi sur un instrument de type triple quadripolaire) pour la caractérisation des analytes. Des incertitudes apparaissent toutefois dans les premières étapes de la méthode, notamment le processus de déconjugaison des métabolites de phase II avec différentes sources enzymatiques et la première étape d'extraction utilisée

pour récupérer les métabolites hydrolysés. Aucune donnée n'ayant été fournie sur la validation de l'hydrolyse enzymatique, il a été conclu que cette étape de l'analyse n'a pas été validée. De plus, les conditions utilisées pour la déconjugaison sont très différentes. L'étape de déconjugaison est probablement la plus délicate dans les méthodes car elle peut entraîner des différences dans les résultats. Il est par ailleurs courant de réaliser l'étape d'hydrolyse après une première extraction de la matrice solide. De plus le tissu original est en général soit digéré (à l'aide par exemple d'une protéase), ou lyophilisé et broyé. Dans ces études, la déconjugaison a été effectuée directement sur le tissu homogénéisé. L'accessibilité du substrat à l'enzyme risque d'être compromise et il est possible que des quantités moindres de conjugués ractopamine aient été hydrolysées, mais les données n'étaient pas suffisantes pour vérifier cette hypothèse.

En résumé, malgré les quelques faiblesses identifiées pour les différentes méthodes d'analyse utilisées pour détecter les résidus dans les trois nouvelles études, il a été noté que la qualité des données analytiques fournies est acceptable, et même si les stratégies utilisées par les trois différents laboratoires sont légèrement différentes, la performance entre les trois laboratoires est quelque peu différente, il est conclu en dernière analyse à la validité de toutes les données aux fins de l'analyse présentée dans cette monographie.

Conclusion et recommandations

Le Comité a conclu que, sur la base des données fournies, y compris celles relatives aux trois races porcines dans les études réalisées par la République populaire de Chine, et les informations alimentaires correspondantes, les LMR recommandées sont conformes aux DJA pour ce qui concerne la consommation de tissus porcins (muscle, foie, rein et graisse). La dose journalière estimée est égale approximativement à 50 pour cent de la limite supérieure de la DJA pour une personne de 60 kg. La substitution de données concernant certains tissus d'organes dans le régime modèle employée par le Comité pour le foie et le rein aurait pour résultat des apports par voie alimentaire qui restent inférieurs à la limite supérieure de la DJA, sauf pour le tissu pulmonaire, pour lequel il faut peut-être envisager des mesures spécifiques de gestion des risques. Étant donné le manque de données internationales sur la consommation alimentaire d'abats et d'autres tissus organiques comme le poumon, il conviendrait que des travaux soient entrepris pour y remédier.