

Programme des produits thérapeutiques  
Holland Cross, tour "B"  
1600, rue Scott  
L.A. # 3102D1  
Ottawa (Ontario)  
K1A 1B6  
le 24 mars 2000

00-003534

Aux Associations, Ordre des pharmaciens, Corporation professionnelle des médecins du Québec :

J'ai le plaisir de vous informer de la publication de la ligne directrice de l' *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*/Programme des produits thérapeutiques, intitulée **Génotoxicité: Batterie d'épreuves normalisées pour l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques (ICH thème S2B)**.

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, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec cette lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Le Programme 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 PPT 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 le PPT auront préséance. Présentement, le Programme des produits thérapeutiques examine la possibilité d'apporter les changements nécessaires aux lignes directrices *Essais de toxicité*, édition 1990.

.../2

Le PPT 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 PPT.

Plusieurs lignes directrices, incluant celle-ci, sont disponibles sur le site Internet du Programme des produits thérapeutiques (PPT) (<http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut>). Pour accéder à la liste des "copies papier" des lignes directrices du Programme des produits thérapeutiques disponibles, veuillez consulter la liste qui apparaît sur les bons de commande de publication et de directives (publiés sur le site Internet du PPT), ou veuillez communiquer avec le coordonnateur / coordonnatrice des publications<sup>1</sup>.

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

D. Peter Grosser  
Programme des essais cliniques et accès spécial  
Bureau de l'évaluation des produits pharmaceutiques  
Programme des produits thérapeutiques  
Santé Canada  
L.A. 0202C1  
Immeuble Finance, Pré Tunney  
OTTAWA, Ontario  
K1A 1B6

Téléphone : (613) 941-2132

Télécopieur : (613) 941-2121

Veuillez agréer, Monsieur (*ou Madame*), l'expression de mes sentiments les meilleurs.

Directeur général

(Original signé par)

Dann M. Michols

Pièce jointe

---

<sup>1</sup> Tel: (613) 954-6466; courrier électronique: [publications\\_coordinator@hc-sc.gc.ca](mailto:publications_coordinator@hc-sc.gc.ca)

## **Avertissement**

Le document ci-joint a été préparé sous la direction de la Programme des produits thérapeutiques, Santé Canada. Aucune modification n'est permise.

# LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE

Génotoxicité: Batterie d'épreuves normalisées pour  
l'évaluation de la génotoxicité des produits  
pharmaceutiques  
ICH thème S2B

Publication autorisée par le  
ministre de la Santé

Date d'approbation par le PPT	1999/12/16
Date d'entrée en vigueur par le PPT	2000/03/24

**Programme des produits thérapeutiques**  
**Ligne Directrice**



Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

*Santé Canada*

Notre Mission: Faire en sorte que les médicaments, les instruments médicaux et les autres produits thérapeutiques disponibles au Canada soient sûrs, efficaces et de grande qualité et que les stupéfiants et drogues d'usage restreint ne fassent l'objet d'aucun abus et ne soient pas détournés de leurs usages légitimes.

*Programme des produits thérapeutiques*

**LE SITE WEB DU PROGRAMME DES PRODUITS THÉRAPEUTIQUES  
(Web-PT)**

**LAISSEZ VOTRE ORDINATEUR FAIRE LES RECHERCHES!**

...Vous voulez savoir comment commercialiser un nouveau médicament?

...Vous souhaitez obtenir des renseignements au sujet du processus de réglementation des médicaments?

...Vous voulez connaître quels sont les médicaments les plus récemment autorisés au Canada?

...Vous souhaitez avoir un accès direct à nos formulaires et à nos politiques?

...Vous voulez connaître sont les contraintes en matière d' étiquetage des médicaments?

Vous pouvez obtenir ces renseignements et plusieurs autres en consultant

**le site web du programme des produits thérapeutiques**  
à

[www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut](http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut)

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2000

Disponible au Canada par l'entremise de  
Santé Canada - Publications  
Edifice Brooke Claxton, L. A. #0913A  
Pré Tunney  
OTTAWA (Ontario)  
K1A 0K9

téléphone : (613) 954-5995

télécopieur : (613) 941-5366

*also available in English under the following Title: Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals*

N° de catalogue H42-2-67/16-1999F

ISBN 0-662-84257-X

## 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, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) 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 du Programme.

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 du PPT et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel du PPT lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer le mandat du Programme d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas de 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 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 le Programme 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 d'être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Le PPT s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

**TABLE DES MATIÈRES**

1.	INTRODUCTION .....	<u>1</u>
2.	BUT GÉNÉRAL DE L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ .....	<u>1</u>
3.	BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ .....	<u>1</u>
4.	MODIFICATION DE LA BATTERIE DE TROIS ÉPREUVES .....	<u>3</u>
4.1	Limites de l'utilisation des bactéries .....	<u>3</u>
4.2	Composés à structure indicatrice d'activité génotoxique .....	<u>4</u>
4.3	Limites des épreuves <i>in vivo</i> normalisées .....	<u>4</u>
4.4	Épreuves additionnelles motivées par les résultats de l'épreuve de cancérogénicité .....	<u>4</u>
4.4.1	Réponse tumorigène .....	<u>4</u>
4.4.2	Composés chimiques à structure exceptionnelle .....	<u>5</u>
5.	ÉPREUVES <i>IN VITRO</i> NORMALISÉES .....	<u>5</u>
6.	REMARQUES .....	<u>6</u>
7.	GLOSSAIRE .....	<u>9</u>

## 1. INTRODUCTION

Les présentes lignes directrices sont destinées à harmoniser l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques, considérée comme une nécessité à deux égards : I) l'instauration d'une batterie d'épreuves normalisées pour l'homologation et II) le degré de confirmation nécessaire dans les épreuves de génotoxicité *in vitro* normalisées. Les autres aspects qu'il a été jugé nécessaire d'harmoniser sont traités dans les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers*. **Comme ces deux lignes directrices de l'ICH se complètent, l'évaluation du pouvoir génotoxique des produits pharmaceutiques doit se faire suivant les principes qui y sont énoncés.**

## 2. BUT GÉNÉRAL DE L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ

On peut définir l'évaluation de la génotoxicité comme un ensemble d'épreuves *in vitro* et *in vivo* par lesquelles il est possible de détecter les composés qui induisent des lésions génétiques directement ou indirectement, c'est-à-dire par l'intermédiaire de divers mécanismes. Ces épreuves doivent permettre de déterminer quel danger posent les lésions causées à l'ADN et dans quelle mesure elles sont fixées, c'est-à-dire permanentes. En général, il est indispensable que la lésion ait la permanence d'une mutation génique, d'une lésion chromosomique étendue, d'une recombinaison ou d'un changement du nombre chromosomique pour que ses effets soient héréditaires ou que survienne la cancérisation, processus complexe aux étapes multiples dans lequel les changements génétiques ne jouent peut-être qu'un rôle partiel. Les composés qui déterminent des réactions positives dans les épreuves permettant de détecter ce genre de lésions peuvent avoir des effets cancérogènes et (ou) mutagènes chez l'humain, c'est-à-dire qu'ils peuvent causer le cancer et (ou) des anomalies héréditaires. On a établi l'existence d'un lien entre l'exposition à certains produits chimiques et la cancérogenèse chez l'humain et, bien que l'existence d'une telle relation soit moins facile à prouver dans le cas des maladies héréditaires, les épreuves de génotoxicité sont utilisées principalement pour prévoir la cancérogénicité. Quoiqu'il en soit, les mutations touchant la lignée germinale sont clairement associées à des maladies chez l'humain, de sorte que si l'on soupçonne un produit d'avoir un effet héréditaire, la question est aussi sérieuse que si l'on soupçonne des propriétés cancérogènes. En outre, les résultats des épreuves de génotoxicité peuvent être utiles pour l'interprétation des études de cancérogénicité.

### 3. BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ

L'homologation d'un produit pharmaceutique nécessite une évaluation approfondie de son potentiel génotoxique. À l'évidence, aucune épreuve ne permet à elle seule de détecter tous les agents génotoxiques. Il devrait donc être de règle de réaliser une batterie d'épreuves de génotoxicité *in vitro* et *in vivo*. Il faut voir ces épreuves comme des éléments complémentaires, non comme les différents niveaux de l'évaluation.

Une batterie d'épreuves normalisées devrait présenter les caractéristiques générales suivantes :

- i) L'épreuve de mutation inverse bactérienne est indiquée pour l'évaluation de la génotoxicité. On a montré qu'elle permet de mettre en évidence des changements génétiques présentant de l'intérêt et de détecter la majorité des agents qui sont cancérogènes pour les rongeurs et qui possèdent des propriétés génotoxiques.
- ii) Les lésions susceptibles de toucher l'ADN mammalien et qui ne peuvent être mesurées de façon satisfaisante chez des bactéries doivent être évaluées dans des cellules mammaliennes. Divers systèmes de cellules mammaliennes peuvent être utilisés à cette fin : certains servent à détecter les lésions chromosomiques macroscopiques (épreuves *in vitro* mettant en évidence les anomalies de la structure chromosomique et du nombre chromosomique), d'autres sont surtout utilisés pour rechercher les mutations géniques (*voir la Remarque 1*), et un dernier permet de mettre en évidence les mutations géniques et les effets clastogènes (épreuve du lymphome murin à gène *tk*) (*voir la remarque 2*). Aux *remarques 3* et *4*, on explique que, si l'on utilise la méthode appropriée (*voir la remarque 5*), les épreuves de détection *in vitro* des lésions chromosomiques et l'épreuve du lymphome murin à gène *tk* donnent des résultats qui présentent entre eux un grand degré de concordance pour les composés considérés comme génotoxiques mais qui donnent des résultats négatifs dans l'épreuve de mutation inverse bactérienne. Par conséquent, ces épreuves sont maintenant considérées comme interchangeables lorsqu'elles sont combinées à d'autres dans une batterie normalisée d'évaluation génotoxique des produits pharmaceutiques, à la condition qu'elles soient réalisées suivant les méthodes appropriées.
- iii) En général, la batterie doit comprendre une épreuve de détection *in vivo* des lésions génétiques qui servira de modèle : on y fait intervenir des facteurs additionnels (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) susceptibles d'influer sur l'activité génotoxique du composé évalué. Les épreuves *in vivo*

permettent de détecter un certain nombre d'autres agents génotoxiques (voir la remarque 5). Une épreuve *in vivo* révélant les lésions chromosomiques dans les cellules hématopoïétiques de rongeur peut faire l'affaire ici; cette épreuve peut porter sur les aberrations chromosomiques touchant les cellules de la moelle osseuse, sur les micronoyaux de la moelle osseuse ou sur les érythrocytes circulants.

À la lumière des considérations énoncées ci-dessus, la batterie d'épreuves normalisées décrite ci-après est recommandée :

- i) Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques
- ii) Une épreuve *in vitro* sur cellules de mammifères permettant l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques **ou** une épreuve *in vitro* sur cellules de lymphome murin à gène *tk*
- iii) Une épreuve *in vivo* sur cellules hématopoïétiques de rongeurs mettant en évidence les lésions chromosomiques

Pour les composés donnant des résultats négatifs, ces trois épreuves, si elles sont réalisées et évaluées suivant les recommandations, permettent habituellement de démontrer de façon suffisamment certaine l'absence d'activité génotoxique (voir la remarque 6). Les composés donnant des résultats positifs peuvent, selon l'usage thérapeutique auquel ils sont destinés, nécessiter une évaluation plus poussée (voir les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers*).

Il ne faudrait pas conclure, parce que certaines épreuves normalisées sont recommandées, que les autres méthodes d'évaluation de la génotoxicité sont généralement insuffisantes ou inacceptables (p. ex. les épreuves portant sur les adduits, les cassures, les produits de réparation d'ADN ou les recombinaisons d'ADN) : ce sont des options auxquelles on peut recourir pour approfondir les résultats obtenus au moyen de la batterie. Par ailleurs, les techniques moléculaires utilisées pour étudier les mécanismes de la génotoxicité dans les épreuves de la batterie peuvent être utiles dans l'évaluation des risques. En fait, ce n'est que dans le cas vraiment exceptionnel où des difficultés techniques rendent impossible la réalisation d'une ou de plusieurs des épreuves de la batterie qu'on peut les remplacer par d'autres méthodes validées. Il faut présenter une justification scientifique suffisante lorsqu'on avance qu'une des épreuves de la batterie n'est pas indiquée.

La batterie ne comprend pas d'épreuve indépendante conçue expressément pour mettre l'aneuploïdie en évidence, mais les épreuves *in vitro* et *in vivo* sur les lésions chromosomiques comportent des éléments qui peuvent nous apporter des données : il s'agit de l'augmentation de l'indice mitotique, de l'induction de la polyploïdie et de l'analyse des micronoyaux. Par ailleurs, un nombre limité de données expérimentales indiquent qu'il est possible de détecter les inducteurs d'aneuploïdie avec l'épreuve du lymphome murin à gène *tk* (voir la remarque 4). Lorsque de tels phénomènes sont mis en évidence, il peut être nécessaire d'approfondir l'étude du produit.

#### 4. MODIFICATION DE LA BATTERIE DE TROIS ÉPREUVES

Ci-après sont décrites des situations où la batterie d'épreuves normalisées peut nécessiter des modifications.

##### 4.1 Limites de l'utilisation des bactéries

Dans certaines circonstances, l'épreuve de mutation inverse bactérienne n'apporte pas une information suffisante ou appropriée pour évaluer la génotoxicité. Ce peut être le cas lorsque le composé évalué est très toxique pour les bactéries (p. ex. certains antibiotiques) ou qu'il a un effet nuisible, présumé ou avéré, sur le système de réplication cellulaire mammalien (p. ex. les inhibiteurs de la topoisomérase, les analogues de nucléosides ou les inhibiteurs du métabolisme de l'ADN). Habituellement dans ce genre de circonstances, il faut faire deux épreuves *in vitro* sur cellules de mammifères en utilisant deux types de cellules différents et en étudiant deux effets différents [mutation génique (voir la remarque 1) et lésion chromosomique]. Quoi qu'il en soit, l'épreuve de mutation inverse bactérienne (voir la remarque 7) demeure importante, qu'elle soit complète ou limitée (délimitation d'une plage de valeurs) (voir la partie 5).

##### 4.2 Composés à structure indicatrice d'activité génotoxique

Habituellement, la batterie d'épreuves normalisées permet de mettre en évidence les composés dont la structure indique des propriétés génotoxiques (voir la remarque 8). Il peut toutefois se révéler nécessaire de pousser un peu plus l'analyse des composés à structure indicatrice qui ont donné des résultats négatifs dans les épreuves normalisées de la batterie. On choisit les épreuves additionnelles à réaliser à cette fin et l'on décide des modifications à apporter aux épreuves normalisées selon la nature du composé et ce qu'on sait sur sa réactivité et son métabolisme (voir la remarque 9 et les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers*).

### 4.3 Limites des épreuves *in vivo* normalisées

Avec certains composés, les épreuves *in vivo* normalisées n'apportent aucune information supplémentaire qui soit utile. Ce sont notamment les composés pour lesquels les études de toxicocinétique ou de pharmacocinétique révèlent qu'ils ne sont pas absorbés dans tout l'organisme, de sorte qu'ils n'atteignent pas les tissus cibles dans les épreuves de génotoxicité *in vivo* de la batterie normalisée. C'est le cas, par exemple, de certains agents de radioimagerie, des antiacides à base d'aluminium et de certains produits pharmaceutiques administrés par voie dermique. Lorsque le tissu cible n'est pas suffisamment exposé, même si la voie d'administration du produit a été modifiée, il peut être indiqué de ne fonder l'évaluation que sur des épreuves *in vitro*.

### 4.4 Épreuves additionnelles motivées par les résultats de l'épreuve de cancérogénicité

#### 4.4.1 Réponse tumorigène

On peut faire des épreuves de génotoxicité additionnelles avec des modèles appropriés lorsque le composé donne des résultats négatifs dans les épreuves de la batterie, mais qu'on a observé des effets dans une ou plusieurs épreuves de cancérogénicité sans pouvoir mettre clairement en évidence un mécanisme non génotoxique. Afin de comprendre le mécanisme d'action, on peut ajouter des épreuves *in vitro* modifiées par un facteur d'activation métabolique ou des épreuves *in vivo* permettant de mesurer les lésions génétiques dans les tissus cibles des agents tumorigènes (p. ex. synthèse d'ADN atypique (UDS) dans les tissus hépatiques, postmarquage au <sup>32</sup>P, induction de mutations dans des transgènes et caractérisation moléculaire des changements génétiques dans des gènes liés à des phénomènes tumoraux).

#### 4.4.2 Composés chimiques à structure exceptionnelle

Il arrive parfois, quoique rarement, qu'un produit tout à fait nouveau, appartenant à une classe de composés à structure exceptionnelle, soit utilisé dans une application pharmaceutique. Pour ce genre de produits, lorsqu'il n'y a pas eu d'épreuves de cancérogénicité chronique chez des rongeurs, il peut être indiqué de pousser l'évaluation de la génotoxicité.

## 5. ÉPREUVES *IN VITRO* NORMALISÉES

La reproductibilité est essentielle dans les travaux de recherche qui font intervenir de nouvelles méthodes ou dont les résultats sont imprévisibles; toutefois, pour l'évaluation de routine réalisée au moyen d'épreuves de génotoxicité normalisées très courantes, il n'est pas toujours nécessaire de tout répéter complètement. En effet, comme ces épreuves sont bien caractérisées et comportent un nombre suffisant d'éléments de contrôle internes, on peut généralement se passer de les répéter si l'on suit des méthodes comportant des éléments confirmatoires comme celles décrites ci-dessous.

Pour les épreuves de mutation génique sur cellules bactériennes ou de mammifères, on peut choisir les concentrations à utiliser dans l'épreuve de mutagenicité finale d'après les résultats de l'épreuve préliminaire de délimitation de plages de concentrations. Ainsi, une épreuve destinée à délimiter une plage de valeurs peut apporter suffisamment de données pour qu'on puisse affirmer que le résultat obtenu est correct. Dans le cas de la mutagenicité sur cellules bactériennes, les épreuves préliminaires de délimitation de plages de valeurs, si elles sont effectuées chez toutes les souches bactériennes, avec et sans activation métabolique, et si elles comprennent des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats ainsi qu'un dénombrement des mutants, peuvent être considérées comme une répétition suffisante pour les fins de l'épreuve finale subséquente. De même, l'épreuve préliminaire de délimitation de plages de valeurs effectuée avec et sans activation métabolique et comprenant des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats ainsi qu'un dénombrement des mutants peut remplacer adéquatement la répétition complète d'une épreuve de mutation génique sur cellules de mammifères sauf dans le cas de l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* (voir ci-après) (voir la remarque 10).

Pour l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques *in vitro*, le protocole prévoit des épreuves avec et sans activation métabolique comprenant des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats, une exposition de 3 à 6 heures et une période d'échantillonnage correspondant approximativement à une fois et demi le cycle cellulaire normal à compter du début du traitement. Si le traitement de courte durée sans activation métabolique donne un résultat négatif, il faut reprendre avec un traitement continu, sans activation métabolique, pendant une période atteignant à peu près une fois et demi le cycle cellulaire normal. Les propriétés de certains produits chimiques sont plus facilement révélées par un traitement de plus longue durée ou par des échantillonnages différés, comme c'est le cas, par exemple, de certains analogues de nucléosides et de certaines nitrosamines. Pour les épreuves avec activation métabolique qui donnent des résultats négatifs, on détermine dans chaque cas s'il y a lieu de faire une épreuve confirmatoire (voir la remarque 11). Quoi qu'il en soit, il convient de recueillir des données sur la ploïdie et, pour ce faire, de déterminer l'incidence des cellules polyploïdes, c'est-à-dire leur

proportion par rapport au nombre de cellules en métaphase. Un indice mitotique élevé ou une incidence accrue de cellules polyploïdes peut donner des indications sur l'aptitude du composé à induire l'aneuploïdie; dans de telles conditions, il peut être nécessaire de faire des analyses additionnelles.

Pour l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, le protocole prévoit des épreuves avec et sans activation métabolique et avec témoins positifs et témoins négatifs adéquats ainsi qu'une exposition de 3 à 4 heures. Si le traitement de courte durée sans activation métabolique donne un résultat négatif, il faut reprendre avec un traitement continu sans activation métabolique d'environ 24 heures (voir la remarque 4). Pour les épreuves avec activation métabolique qui donnent des résultats négatifs, on détermine dans chaque cas s'il y a lieu de faire une épreuve confirmatoire (voir la remarque 11). Quoiqu'il en soit, pour être acceptable, une épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* doit comprendre : i) des témoins positifs qui produisent surtout des petites colonies, ii) une évaluation de la taille des colonies pour le repérage des témoins positifs, des témoins en solvant et au moins une dose de composé donnant des résultats positifs dans une épreuve (s'il y en a), y compris la culture dans laquelle on a mesuré la fréquence de mutants la plus élevée.

Après avoir réalisé ces épreuves, la confirmation n'est généralement pas nécessaire si les résultats sont nettement négatifs ou positifs.

Idéalement, il devrait être possible de fournir des résultats nettement positifs ou nettement négatifs. Toutefois, il arrive parfois que les résultats obtenus ne satisfassent pas aux critères prédéterminés définissant la désignation positive ou négative, si bien qu'ils sont dits « douteux ». Les analyses statistiques revêtent une importance capitale dans l'interprétation des données. Néanmoins, il est habituellement opportun de pousser l'évaluation lorsque les résultats sont douteux.

## 6. REMARQUES

- 1) Les épreuves actuellement acceptées pour l'évaluation des mutations géniques sur cellules de mammifères portent sur le locus *tk* des cellules L5178Y de lymphome murin ou des cellules lymphoblastoïdes TK6 d'humains, sur le locus *hprt* de cellules CHO, V79 ou L5178Y, ou sur le locus *gpt* de cellules AS52.
- 2) La dissection moléculaire des mutants du locus *tk* révèle toute une variété de phénomènes génétiques dont des mutations ponctuelles, des délétions, des translocations, des recombinaisons, etc. Il a été démontré que la plupart des bactéries mutantes formatrices de petites colonies sont dépourvues de l'allèle *tkb* à cause de modifications de la structure chromosomique, de changements du nombre chromosomique ou de phénomènes de

recombinaison. Certaines données indiquent que d'autres locus, comme *hprt* ou *gpt*, sont également susceptibles d'être le siège de délétions d'envergure. Toutefois, comme le gène *hprt* provient du chromosome X et qu'il est probablement flanqué de gènes essentiels, il arrive souvent que les délétions de grande envergure ou les changements du nombre chromosomique n'engendrent pas de colonies mutantes; ainsi, pour toute une variété de changements génétiques, le locus *hprt* est un moyen de détection moins sensible que le locus *tk*.

- 3) Dans l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques, avec les systèmes actuellement en usage, c'est-à-dire divers systèmes de culture permanente de cellules de mammifères et de lymphocytes humains isolés ou conservés dans du sang entier, il n'est pas rare qu'on obtienne des résultats différents pour un même produit. On a toutefois des raisons de croire que certaines des disparités observées sont dues à des différences de méthode. On peut limiter ce facteur de divergence en utilisant les méthodes décrites dans la *partie 5*.

Pour la grande majorité des composés présumés génotoxiques qui donnent des résultats négatifs dans l'épreuve de mutation inverse, les données sur les lésions chromosomiques observées *in vitro* concordent avec les résultats de l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. Plusieurs études fiables indiquent que l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* permet de trouver les composés qui causent des lésions à la structure chromosomique et des changements du nombre chromosomique. Pour l'évaluation de l'innocuité des produits pharmaceutiques, l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* est considérée comme un substitut acceptable de l'analyse directe des lésions chromosomiques *in vitro*. L'évaluation de la taille des colonies est un élément essentiel de l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, mais elle n'apporte que des données limitées sur la nature des lésions déterminées dans les colonies mutantes. On peut faire d'autres analyses sur les mécanismes d'action pour connaître la nature des changements cytogénétiques provoqués par les agents clastogènes et les inducteurs d'aneuploïdie dans l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. À cet égard, les travaux destinés à mettre en évidence la disparition du gène *tk* ou du chromosome portant le gène *tk* peuvent être éclairants.

- 4) Avec l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, un certain nombre d'analogues de nucléosides et d'analogues de bases se détectent mieux et ce, tant avec le procédé en gélose qu'avec le microtitrage, lorsqu'on applique un régime de traitement de 24 heures sans système d'activation métabolique exogène. De même, la détection des inducteurs d'aneuploïdie est meilleure avec le procédé à microtitrage si l'on applique un régime de traitement de 24 heures. Actuellement, rien ne permet d'affirmer la même chose pour le procédé en gélose molle. Avec le microtitrage, le traitement de 24 heures ne modifie pas

dans une mesure significative la spécificité de l'épreuve, c'est-à-dire que celle-ci donnera des résultats exacts pour les composés présumés non génotoxiques; par contre, dans le cas du procédé à gélose molle, il semble que la spécificité de l'épreuve soit moindre lorsqu'on applique un régime de traitement de 24 heures. À la lumière de ces constatations, le microtitrage est recommandé pour la batterie d'épreuves normalisées.

- 5) Un nombre limité, mais non négligeable, de produits cancérigènes dont les propriétés génotoxiques sont toujours mises en évidence dans les épreuves sur moelle osseuse révélant les lésions chromosomiques ont donné des résultats négatifs, douteux ou contradictoires dans deux des épreuves *in vitro* de la batterie d'épreuves normalisées, soit, par exemple, la mutation inverse bactérienne combinée à l'une des épreuves possibles pour l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques, ou la mutation bactérienne combinée à l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. Des substances cancérigènes comme la procarbazine, l'hydroquinone, l'uréthane et le benzène appartiennent à ce groupe.
- 6) Comme les épreuves à court terme et la méthodologie évoluent sans cesse, on mettra au point de nouvelles techniques plus sensibles, plus pratiques, plus rapides et plus économiques pour détecter les produits génotoxiques. Certaines d'entre elles finiront peut-être par remplacer les épreuves de génotoxicité utilisées pour les vérifications exigées par la réglementation. Parmi les techniques les plus prometteuses, l'épreuve des micronoyaux *in vitro* semble avoir du potentiel comme procédé de sélection.
- 7) Avec l'épreuve de la mutation inverse bactérienne, on peut mettre en évidence les propriétés génotoxiques de certains agents antibactériens très toxiques pour les souches employées en utilisant des concentrations sublétales très faibles (p. ex. les nitrofurannes).
- 8) On a déterminé l'existence d'une relation causale entre certains groupements à structure indicatrice et le potentiel cancérigène et (ou) mutagène des produits chimiques dont ils font partie. Les noyaux électrophiles alkylants, les époxydes instables, les amines aromatiques, les groupements azo, les groupements N-nitroso et les groupements nitro aromatiques en sont des exemples.
- 9) Pour certaines classes de composés possédant une structure indicatrice déterminée, il a été établi qu'il faut apporter certaines modifications aux méthodes ou faire certaines épreuves supplémentaires pour que la mise en évidence des propriétés génotoxiques soit optimale (p.ex. les molécules renfermant un groupement azo, les glycosides, les composés dont l'activation nécessite une nitroréduction comme les nitroimidazoles, ainsi que les composés dont l'activation métabolique nécessite une autre fraction S9 de rongeur,

comme la phénacétine). Lorsque les trois épreuves normalisées retenues dans la batterie donnent des résultats négatifs pour un composé à structure indicatrice, les épreuves additionnelles peuvent comporter ce genre de modifications.

- 10) L'étude devant permettre de délimiter la plage de doses doit i) permettre d'établir la courbe dose-toxicité lorsque le composé évalué a des effets toxiques, ii) comprendre des concentrations très toxiques et iii) permettre de quantifier les mutants aux concentrations cytotoxiques. Si le composé n'est pas toxique, il faut quand même dénombrer les mutants.
- 11) Il n'est habituellement pas nécessaire de répéter l'épreuve avec le même système d'activation métabolique utilisé à la même concentration. Il peut être indiqué de modifier le système d'activation métabolique pour certaines classes de composés chimiques lorsqu'on connaît leurs exigences métaboliques particulières. En général, il faut alors utiliser un système métabolique externe apte à métaboliser et à activer les composés de la classe à laquelle appartient celui qui est évalué.

## 7. GLOSSAIRE

*évaluation cytogénétique* : étude au microscope optique de la structure chromosomique pendant la mitose ou la méiose

*adduit d'ADN* : résultat d'une liaison (covalente) entre des produits chimiques et de l'ADN

*réparation de l'ADN* : reconstitution d'une séquence d'ADN présentant une lésion

*cassure d'ADN* : rupture d'un ou de deux brins d'ADN

*changement du nombre chromosomique* : il y a changement du nombre chromosomique lorsque le nombre de chromosomes des cellules obtenues est différent de celui des cellules haploïdes ou diploïdes initiales; dans le cas de lignées cellulaires, il y a changement lorsque le nombre de chromosomes diffère du nombre chromosomique type

*recombinaison* : processus au cours duquel l'ADN est coupé puis lié à nouveau, de façon équilibrée ou non

*transgène* : gène exogène ou étranger inséré dans le génome de la cellule hôte somatique ou de germinale