



Santé
Canada Health
Canada

Le 21 janvier 2016

Avis

Notre référence : 15-114028-981

L'adoption pour International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (l'ICH) ligne directrice : S2(R1) : Directive sur l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques destinés à l'utilisation humaine et interprétation des données

Santé Canada a le plaisir d'annoncer l'adoption de cette ligne directrice de l'ICH S2(R1) : Directive sur l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques destinés à l'utilisation humaine et interprétation des données.

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

Téléphone : 613-941-3171

Télécopieur : 613-941-1365

Canada 



LIGNE DIRECTRICE

Directive sur l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques destinés à l'utilisation humaine et interprétation des données
ICH thème S2(R1)

Publication autorisée par le
ministre de la Santé

Date d'approbation	2016/01/21
Date mis en vigueur	2016/01/21

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"> • 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 • 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. <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: ICH guidance document S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use

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

Code	Historique	Date
------	------------	------

S2A :

Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : Aspects particuliers

S2A	Approbation du Comité directeur en tant qu' <i>étape 2</i> et publication aux fins de consultation publique.	10 mars 1994
S2A	Approbation du Comité directeur en tant qu' <i>étape 4</i> et recommandation d'adoption aux trois organismes de réglementation de l'ICH.	19 juillet 1995

S2B :

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

S2B	Approbation du Comité directeur en tant qu' <i>étape 2</i> et publication aux fins de consultation publique.	2 octobre 1996
S2B	Approbation du Comité directeur en tant qu' <i>étape 4</i> et recommandation d'adoption aux trois organismes de réglementation de l'ICH.	16 juillet 1997

S2(R1) :

Révision des lignes directrices S2A et S2B qui ont été combinées dans le cadre de la révision

S2(R1)	Approbation du Comité directeur du thème S2(R1) en tant qu' <i>étape 2</i> et publication aux fins de consultation publique.	6 mars 2008
--------	--	-------------

Version actuelle de l'*étape 4*

S2(R1)	Approbation du Comité directeur du thème S2(R1) en tant qu' <i>étape 4</i> et recommandation d'adoption aux trois organismes de réglementation de l'ICH.	9 novembre 2011
--------	--	-----------------

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectifs de la directive.....	1
1.2 Contexte	1
1.3 Portée de la directive	1
1.4 Principes généraux	1
2 BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ.....	2
2.1 Justification	2
2.2 Description des deux options de batterie d'épreuves normalisées.....	3
2.3 Modifications de la batterie d'épreuves	5
2.3.1 Études cliniques exploratoires	5
2.3.2 Composés toxiques pour les bactéries.....	6
2.3.3 Composés à structure indicatrice d'activité génotoxique	6
2.3.4 Limites des épreuves in vivo normalisées	6
2.4 Détection des mutagènes des cellules germinales.....	7
3 RECOMMANDATIONS SUR LES ÉPREUVES IN VITRO	7
3.1 Répétition et interprétation des épreuves	7
3.2 Protocole recommandé pour l'épreuve de mutation bactérienne.....	7
3.2.1 Choisir la dose maximale.....	7
3.2.2 Conception de l'étude et protocole d'essai	8
3.3 Protocoles recommandés pour les épreuves sur les cellules de mammifères	9
3.3.1 Sélection de la concentration maximale	9
3.3.2 Conception de l'étude et protocole d'essai	9
3.3.3 Témoins positifs.....	10
4. RECOMMANDATIONS POUR LES ÉPREUVES IN VIVO.....	11
4.1 Épreuves pour la détection de lésions chromosomiques in vivo.....	11
4.2 Autres épreuves de génotoxicité in vivo	11
4.3 Choix de la dose pour les épreuves in vivo.....	12
4.3.1 Études de courte durée	12

4.3.2	Études avec administration répétée.....	12
4.3.3	Composés toxiques pour le sang ou la moelle osseuse mis à l'essai.....	13
4.4	Démonstration de l'exposition des tissus cibles pour les résultats des essais in vivo....	14
4.4.1	Lorsqu'un essai de la génotoxicité in vitro est positif (ou n'est pas effectué)	14
4.4.2	Lorsque les résultats des essais in vitro sont négatifs.....	15
4.5	Temps d'échantillonnage pour les essais in vivo.....	15
4.6	Nombre d'animaux analysés.....	16
4.7	Utilisation de rongeurs mâles ou femelles pour les tests de génotoxicité in vivo.....	16
4.8	Voie d'administration.....	16
4.9	Utilisation des témoins positifs dans les études in vivo.....	17
5	CONSEILS SUR L'ÉVALUATION DES RÉSULTATS DE TESTS ET DES STRATÉGIES DE SUIVI.....	17
5.1	Évaluation de la pertinence biologique.....	17
5.2	Évaluation des résultats obtenus dans les essais in vitro.....	18
5.2.1	Évaluation des résultats positifs obtenus in vitro lors d'une épreuve de mutation bactérienne.....	18
5.2.2	Évaluation des résultats positifs obtenus in vitro lors d'épreuves sur les cellules de mammifères.....	18
5.2.3	Évaluation des résultats négatifs in vitro.....	19
5.3	Évaluation des résultats obtenus dans les essais in vivo.....	19
5.4	Stratégies de suivi pour les résultats positifs.....	20
5.4.1	Suivi des conclusions tirées des tests in vitro sur les cellules de mammifères.....	20
5.4.2	Suivi d'une épreuve positive sur le micronoyau in vivo.....	22
5.5	Épreuve de génotoxicité de suivi par rapport aux phénomènes tumorigènes observés lors des bioessais sur la cancérogénicité.....	22
6.	NOTES.....	22
7.	GLOSSAIRE.....	29
8.	RÉFÉRENCES.....	32

1. INTRODUCTION

1.1 Objectifs de la directive

La présente directive remplace et compile les lignes directrices S2A et S2B de l'ICH. L'objectif de la révision est d'optimiser la batterie standard d'épreuves de toxicologie génétique afin de prévoir les risques éventuels pour les humains, ainsi que de fournir une orientation sur l'interprétation des résultats, le but ultime étant d'améliorer la caractérisation des risques en matière d'effets cancérogènes dont l'origine se situe dans les changements apportés au matériel génétique. La directive révisée décrit des normes acceptées à l'échelle internationale en ce qui a trait aux essais de suivi et à l'interprétation des résultats positifs *in vitro* et *in vivo* retrouvés dans la batterie d'épreuves d'évaluations de la toxicologie génétique, y compris une évaluation des conclusions non pertinentes. La présente directive est destinée à ne s'appliquer qu'aux produits développés en tant que produits pharmaceutiques pour les humains.

1.2 Contexte

Les recommandations tirées des dernières lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) et des rapports provenant des International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) [Colloques internationaux sur les essais de génotoxicité (CIEG)] ont été pris en compte, le cas échéant. Dans certains cas, il existe des différences comparativement aux recommandations de l'OCDE et des [IWGT], et celle-ci sont notées dans le texte. Les notes suivantes aux fins d'orientation doivent être mises en pratique en conjonction avec d'autres directives de l'ICH.

1.3 Portée de la directive

Le point central de la présente directive concerne les essais de substances pharmaceutiques à petites molécules, et ne s'applique pas aux produits biologiques. Les conseils portant sur le moment d'effectuer les études en ce qui a trait au développement clinique sont fournis dans la directive de l'ICH thème M3(R2).

1.4 Principes généraux

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 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 ou d'une recombinaison pour que ses effets soient héréditaires ou que survienne la cancérisation, processus complexe aux étapes multiples dans

lesquelles les changements génétiques ne jouent peut-être qu'un rôle partiel. Les changements dans le nombre de chromosomes ont aussi été associés à la tumorigénèse et peuvent indiquer une possibilité d'aneuploïdie dans les cellules germinales. Les composés qui déterminent des réactions positives dans les épreuves permettant de détecter ce genre de lésions peuvent avoir des effets cancérigènes et/ou mutagènes chez l'humain. 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 cancérigènes. En outre, les résultats des épreuves de génotoxicité peuvent être utiles pour l'interprétation des études de cancérogénicité.

2 BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ

2.1 Justification

L'homologation d'un produit pharmaceutique nécessite une évaluation approfondie de son potentiel génotoxique. Des examens approfondis ont montré que de nombreux composés mutagènes dans les épreuves de mutation inverse bactérienne (épreuve d'Ames) sont cancérigènes pour les rongeurs. L'ajout d'essais *in vitro* chez les mammifères augmente la sensibilité pour le dépistage de cancérigènes chez les rongeurs et élargit le spectre des modifications génétiques détectées, mais diminue aussi la précision des prédictions : c'est-à-dire (c.-à-d.) qu'ils augmentent l'incidence de résultats positifs sans lien avec la cancérogénicité chez les rongeurs. Néanmoins, le recours à une batterie d'épreuves est tout de même raisonnable, car il n'existe aucun test capable de détecter tous les mécanismes génotoxiques ayant trait à la tumorigénèse.

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

- i. Évaluation de la mutagénicité à l'aide d'une épreuve de mutation inverse bactérienne. Cette épreuve a démontré qu'elle détecte les modifications génétiques pertinentes et la majeure partie des cancérigènes génotoxiques chez les rongeurs et les humains.
- ii. La génotoxicité doit aussi être évaluée dans les cellules de mammifères *in vitro* et *in vivo* de la façon suivante :

Plusieurs systèmes de cellules de mammifères *in vitro* sont utilisés couramment et peuvent être jugés suffisamment validés : l'essai *in vitro* d'aberration chromosomique en métaphase, l'essai de micronoyau *in vivo* (Note 1) et l'épreuve de mutation génétique du locus *tk* (thymidine kinase) des cellules L5178Y du lymphome de souris (ELS). Ces trois épreuves sont actuellement

jugées également appropriées et sont par conséquent interchangeables pour mesurer les lésions chromosomiques lorsqu'elles sont combinées à d'autres tests d'évaluation de la génotoxicité dans une batterie normalisée d'évaluation des produits pharmaceutiques, à condition qu'elles soient réalisées suivant les méthodes appropriées recommandées dans la présente directive.

Des épreuves *in vivo* sont comprises à la batterie d'évaluation, car certains agents sont mutagènes *in vivo*, mais non *in vitro* (Note 2) et parce qu'il est souhaitable de comprendre des essais qui tiennent compte de facteurs tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. C'est pour cette raison que l'on inclut le choix d'une analyse des micronoyaux des érythrocytes (circulants ou de la moelle osseuse) ou des aberrations chromosomiques touchant les cellules de la moelle osseuse en métaphase (Note 3). Les lymphocytes cultivés dans des animaux traités peuvent aussi être utilisés pour faire une analyse cytogénétique, mais les expériences utilisant de telles analyses sont moins courantes.

Les épreuves *in vitro* et *in vivo* qui mesurent les aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase peuvent détecter une vaste gamme de changements de l'intégrité des chromosomes. Les cassures de chromatides ou de chromosomes peuvent entraîner la formation d'un micronoyau lorsqu'elles provoquent la formation d'un fragment acentrique. En conséquence, les tests permettant de détecter les aberrations chromosomiques ou les micronoyaux conviennent à la détection des clastogènes. Les micronoyaux peuvent également découler du retard d'un ou de plusieurs chromosomes entiers à l'anaphase; les essais de détection des micronoyaux offrent donc la possibilité de détecter certains inducteurs de l'aneuploïdie. L'ELS détecte les mutations présentes dans le gène *tk* qui proviennent des mutations génétiques, mais aussi des lésions chromosomiques. Il existe certaines données probantes selon lesquelles l'ELS peut aussi détecter la perte chromosomique.

Il existe plusieurs épreuves *in vivo* supplémentaires pouvant être utilisées dans la batterie ou en tant que tests de suivi afin de développer le poids de la preuve lors de l'évaluation des résultats des épreuves *in vivo* ou *in vitro* (voir ci-dessous). Les résultats négatifs obtenus dans les essais *in vivo* (deux, habituellement) accompagnés de justifications suffisantes pour ce qui est des paramètres mesurés ainsi que de la démonstration de l'exposition (voir la section 4.4) sont généralement jugés suffisants pour démontrer l'absence de risque génotoxique important.

2.2 Description des deux options de batterie d'épreuves normalisées

Les deux possibilités suivantes de batterie d'épreuves normalisées sont jugées également adéquates (Note 4) :

Option 1

- i. Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques.
- ii. Une épreuve cytogénétique mettant en évidence les lésions chromosomiques (le test

d'aberrations chromosomiques en métaphase in vitro ou le test in vitro sur les micronoyaux) ou une épreuve de mutation génique in vitro sur les cellules de lymphome murin à gène *tk*.

- iii. Une épreuve in vivo pour détecter la génotoxicité, en général une épreuve sur les cellules hématopoïétiques de rongeurs mettant en évidence les lésions chromosomiques, soit pour les micronoyaux, soit pour les aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase.

Option 2

- i. Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques.
- ii. Une évaluation de la génotoxicité in vivo en utilisant deux tissus différents, habituellement une évaluation des micronoyaux au moyen de cellules hématopoïétiques de rongeurs, ainsi qu'une deuxième épreuve in vivo. Normalement, il s'agirait d'une épreuve de fracture du brin d'ADN dans le foie, sauf dans les cas justifiés par ailleurs (voir ci-dessous; aussi section 4.2 et Note 12).

Il existe davantage d'expériences traditionnelles au moyen de l'option 1, car elle est fondée sur les lignes directrices thèmes S2A et B. Néanmoins, voici les motifs justifiant les options 1 et 2 comme étant également acceptables : lorsque l'on juge qu'un résultat positif se présentant au cours d'un essai in vitro sur les cellules de mammifères ou que des résultats clairement négatifs dans deux essais in vivo bien menés dans les tissus appropriés et dont on démontre une exposition adéquate constituent des preuves suffisantes d'un manque de potentiel génotoxique in vivo (voir la section 5.4.1.1 ci-dessous). Par conséquent une stratégie de mise à l'essai dans laquelle on mène deux essais in vivo est en fait la même stratégie que celle qui serait utilisée suite à l'obtention d'un résultat positif in vitro (Note 4).

Dans le cadre des deux possibilités de batterie d'épreuves normalisées, on peut utiliser la méthodologie d'étude à dose aiguë ou à doses multiples in vivo. Si scientifiquement justifié, on doit tenter d'incorporer les paramètres de génotoxicité dans les études de toxicité en cas d'administrations répétées. Lorsque l'on évalue plus d'un paramètre in vivo, il est préférable de les incorporer dans une seule étude. Souvent, des renseignements suffisants sur les doses probablement adéquates dans le cadre d'une étude de la toxicité à doses multiples sont disponibles avant le commencement de l'étude et peuvent être utilisés afin de déterminer si une épreuve aiguë ou intégrée sera adéquate.

En ce qui a trait aux composés qui engendrent des résultats négatifs, l'achèvement de l'une ou l'autre option de batterie d'épreuves normalisées, tant qu'elle est menée et évaluée conformément aux recommandations actuelles, fournira habituellement une assurance suffisante de l'absence d'activité génotoxique, ce qui rend toute autre épreuve superflue. Les composés qui engendrent des résultats positifs dans la batterie d'épreuves normalisées pourraient, selon leur utilisation thérapeutique, devoir être mis à l'essai davantage.

Il existe plusieurs épreuves in vivo qui peuvent être utilisées pour la deuxième partie de l'évaluation in vivo dans le cadre de l'option 2 (voir la section 4.2), certaines d'entre elles pouvant être intégrées aux études de la toxicologie à doses multiples. Le foie est généralement le tissu de choix en raison de la capacité d'exposition et de métabolisation, mais le choix de tissu et d'épreuve in vivo doit être fondé sur des facteurs comme les connaissances quant au mécanisme éventuel, du métabolisme in vivo ou aux tissus exposés jugés pertinents.

Des renseignements sur les modifications numériques peuvent être obtenus des épreuves sur les cellules de mammifères in vitro et des épreuves du micronoyau in vitro ou in vivo. Les éléments des protocoles standards qui peuvent indiquer ce potentiel sont l'augmentation de l'indice mitotique, l'induction de la polyploïdie et l'analyse des micronoyaux. Il existe aussi des preuves expérimentales que les poisons du fuseau peuvent être détectés lors de l'ELS. L'épreuve cytogénétique in vivo de choix dans le cadre de l'option 2 est le test du micronoyau, et non un test d'aberration chromosomique, afin d'inclure une capacité de détection plus directe des pertes chromosomiques (potentiel d'aneuploïdie).

L'ensemble suggéré d'épreuves normalisées ne signifie pas que les autres épreuves de génotoxicité sont généralement jugées inadéquates ou inappropriées. Des épreuves supplémentaires peuvent être utilisées pour faire une étude plus approfondie des résultats des épreuves de la génotoxicité obtenus à l'aide de la batterie d'épreuves normalisées (voir les sections 4.2 et 5). D'autres espèces, y compris des non-rongeurs, peuvent aussi être utilisées si indiqué, et si suffisamment validé.

Si des difficultés techniques rendent impossible la réalisation d'une ou de plusieurs épreuves de la batterie, on peut les remplacer par d'autres méthodes validées pourvu que l'on présente une justification scientifique suffisante.

2.3 Modifications de la batterie d'épreuves

Les sections suivantes décrivent des situations où une modification de la batterie d'épreuves normalisées pourrait être utile.

2.3.1 Études cliniques exploratoires

En ce qui a trait à certaines études cliniques exploratoires, une quantité moins élevée d'épreuves de la génotoxicité ou différents critères de justification de la dose maximale in vivo pourraient s'appliquer (consulter la directive de l'ICH thème M3(R2)).

2.3.2 Composés toxiques pour les bactéries

Lorsque les composés sont très toxiques pour les bactéries [par exemple (p. ex.), certains antibiotiques], l'épreuve de mutation inverse bactérienne (épreuve d'Ames) doit néanmoins être effectuée, tout comme les composés cytotoxiques sont soumis à des essais dans les cellules de mammifères, car la mutagenicité peut se produire à des concentrations plus basses et moins toxiques. Dans ce cas, l'une des épreuves *in vitro* sur les cellules de mammifères doit aussi être effectuée, c.-à-d. que l'on doit suivre l'option 1.

2.3.3 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 (Note 5) puisque la plus grande partie des composés à structure indicatrice sont définis en lien à la mutagenicité bactérienne. Certaines catégories chimiques sont reconnues comme étant plus facilement détectées lors des épreuves de lésions chromosomiques sur des cellules de mammifères que lors des épreuves de mutation bactérienne. Par conséquent, l'obtention de résultats négatifs dans l'une ou l'autre des batteries à l'aide d'un composé à structure indicatrice est normalement associée à une assurance suffisante de l'absence de génotoxicité. Toutefois, en ce qui a trait aux composés possédant une structure indicatrice particulière, il peut être approprié de faire une modification des protocoles standards (Note 5). 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.

2.3.4 Limites des épreuves *in vivo* normalisées

Avec certains composés, les épreuves *in vivo* (habituellement dans la moelle osseuse, le sang ou le foie) n'apportent aucune information supplémentaire 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. C'est le cas, par exemple, de certains agents de radioimagerie, des antiacides à base d'aluminium, de certains composés administrés par inhalation et de certains produits pharmaceutiques administrés par voie dermique ou topique. Lorsque le tissu cible n'est pas suffisamment exposé, même si la voie d'administration du produit a été modifiée, et qu'aucune épreuve de la génotoxicité appropriée n'est disponible dans le tissu le plus exposé, il peut être indiqué de ne fonder l'évaluation que sur des épreuves *in vitro*. Parfois, il peut être justifié d'évaluer les effets génotoxiques au site d'introduction, bien que de telles épreuves ne sont pas encore très répandues (Note 6).

2.4 Détection des mutagènes des cellules germinales

Les résultats des études comparatives ont démontré qu'au plan qualitatif, la plupart des mutagènes des cellules germinales risquent d'être détectés par les tests portant sur les cellules somatiques, et les résultats négatifs des études de génotoxicité sur les cellules somatiques in vivo indiquent généralement l'absence d'effet sur les cellules germinales.

3 RECOMMANDATIONS SUR LES ÉPREUVES IN VITRO

3.1 Répétition et interprétation des épreuves

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 souvent pas nécessaire de tout répéter. En effet, comme ces épreuves sont bien caractérisées et comportent un nombre suffisant d'éléments de contrôle internes, on peut généralement se passer de répéter une épreuve clairement positive ou négative. 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 peuvent aider l'interprétation des données, toutefois l'interprétation biologique adéquate revêt une importance capitale. Une épreuve douteuse qui est répétée peut engendrer (i) un résultat nettement positif, et par conséquent un résultat positif dans l'ensemble, (ii) un résultat négatif, de sorte que le résultat ne peut être reproduit et négatif dans l'ensemble ou (iii) un autre résultat douteux laissant la conclusion comme douteuse.

3.2 Protocole recommandé pour l'épreuve de mutation bactérienne

Les conseils sur les protocoles sont inscrits dans la directive de l'OCDE (1997) et le rapport des [IWGT] (Gatehouse et coll., 1994).

3.2.1 Choisir la dose maximale

Niveau de la dose maximale

Le niveau de dose maximum recommandé est de 5 000 microgramme (μg)/boîte (ou 5 microlitre (μL)/boîte pour les substances d'essai liquides) lorsque la solubilité ou la cytotoxicité n'impose aucune limite.

Limite de solubilité

En ce qui a trait aux cultures bactériennes, les concentrations de précipitation sont mesurés pourvu que le précipité ne nuise pas à la mesure, que la toxicité n'impose aucune

limite et que la concentration maximale ne dépasse pas 5 000 µg/boîte (ou 5 µL/boîte pour les substances d'essai liquides). Si l'on n'observe aucune cytotoxicité, la concentration de précipitation minimale doit être utilisée en tant que dose maximale mesurée. Si l'on observe une cytotoxicité ou mutagénicité liée à la dose, indépendamment de la solubilité, la dose maximale mesurée doit être fondée sur la cytotoxicité comme il est décrit ci-dessous.

Limite de cytotoxicité

Lors de l'épreuve d'Ames, les doses mesurées doivent montrer des traces de toxicité importante, sans dépasser une dose maximale de 5 000 µg/boîte. Cette toxicité pourrait être mise en évidence par une réduction du nombre de révertants, ou un éclaircissement ou une réduction du tapis.

3.2.2 Conception de l'étude et protocole d'essai

Le groupe recommandé de lignées bactériennes (OCDE) comprend celles qui détectent la substitution des bases et les mutations ponctuelles par déphasage comme celles-ci :

- *Salmonella typhimurium* TA98;
- *Salmonella typhimurium* TA100;
- *Salmonella typhimurium* TA1535;
- *Salmonella typhimurium* TA1537 **ou** TA97 **ou** TA97a; et soit *Salmonella typhimurium*

TA102 **ou** *Escherichia coli* WP2 *uvrA* **ou** *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

L'une des différences par rapport aux recommandations de l'OCDE et des [IWGT] est que, à la lumière des expériences faites en mettant des produits pharmaceutiques à l'essai, une seule épreuve de mutation bactérienne (Ames) est jugée suffisante lorsque son résultat est nettement négatif ou positif, et effectuée selon une méthode entièrement adéquate comprenant toutes les souches avec et sans activation métabolique, une plage de doses adéquate qui répond aux critères de sélection de la dose maximale et des éléments de contrôle positifs et négatifs appropriés. Aussi, pour la mise à l'essai de produits pharmaceutiques, la méthode d'incorporation directe et de préincubation est jugée appropriée en ce qui a trait à cette expérience en particulier (Note 7). Des résultats douteux ou faiblement positifs pourraient indiquer qu'il serait approprié de répéter l'épreuve, possiblement au moyen d'une méthode modifiée, par exemple des niveaux de dose espacés de façon adéquate.

3.3 Protocoles recommandés pour les épreuves sur les cellules de mammifères

Des conseils sur les protocoles sont inscrits dans les lignes directrices de l'OCDE (1997) et les publications des [IWGT] (p.ex. Kirsch-Volders et coll., 2003; Moore et coll., 2006). On donne également des conseils sur l'interprétation des résultats de l'ELS (Moore et coll., 2006), notamment sur l'utilisation d'un facteur d'évaluation global. On remarque ici plusieurs différences comparativement à ces recommandations en ce qui a trait à la mise à l'essai de produits pharmaceutiques, notamment pour la sélection de la concentration maximale. (Voir les précisions ci-dessous.)

3.3.1 Sélection de la concentration maximale

Concentration maximale

La concentration maximale recommandée est de 1 millimolar (mM) ou 0,5 milligramme/millilitre (mg/ml), selon l'unité la plus basse lorsque la cytotoxicité ou la solubilité n'impose aucune limite dans le solvant ou le milieu de culture (Note 8).

Limite de solubilité

Lorsque la solubilité impose une limite, la concentration maximale (si elle n'est pas limitée par la cytotoxicité) doit être la concentration la plus basse à laquelle le précipité minimal est visible dans les cultures, tant que cela ne nuit pas à la mesure. L'évaluation de la précipitation peut être effectuée à l'œil nu ou à l'aide de méthodes comme la microscopie photonique en notant les précipités qui persistent ou apparaissent au cours de la culture (à la fin du traitement).

Cytotoxicité

En ce qui a trait aux essais cytogénétiques in vitro sur les aberrations chromosomiques en métaphase ou sur les micronoyaux, la cytotoxicité ne doit pas dépasser une diminution d'environ 50 % de la croissance cellulaire (Notes 9 et 10). Pour ce qui est de l'ELS, le degré de cytotoxicité doit se situer de 80 à 90 % à la dose maximale comme mesuré par un GRT de 20 à 10 % (Note 9).

3.3.2 Conception de l'étude et protocole d'essai

Pour l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques sur les cellules en métaphase in vitro, le protocole doit comprendre des épreuves avec et sans activation métabolique comprenant des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats. Le traitement utilisant les produits mis à l'essai devrait durer de trois à six heures et une période d'échantillonnage correspondant approximativement à 1,5 fois le cycle cellulaire normal à compter du début du traitement. Si les deux traitements de courte durée avec et sans activation métabolique donnent un résultat négatif ou douteux, il faut reprendre avec

un traitement continu, sans activation métabolique, pendant une période atteignant à peu près 1,5 fois le cycle cellulaire normal. Les mêmes principes s'appliquent pour les essais in vitro sur les micronoyaux, sauf que la période d'échantillonnage est habituellement de 1,5 à 2 fois le cycle cellulaire normal à partir du début du traitement afin de permettre aux cellules d'achever la mitose et de passer à la prochaine interphase. Pour les deux essais cytogénétiques in vitro, il pourrait être nécessaire de modifier le protocole quant à certains types de produits chimiques dont les propriétés sont plus facilement révélées par un traitement de plus longue durée, par des échantillonnages ou des périodes de rétablissement différées, comme c'est le cas, par exemple, de certains analogues de nucléosides et de certaines nitrosamines.

Lors de l'épreuve d'aberration en métaphase, il convient de recueillir des données sur la ploïdie et, pour ce faire, de déterminer l'incidence des cellules polyploïdes (y compris les cellules endoredupliquées) en métaphase, c'est-à-dire leur proportion par rapport au nombre de cellules en métaphase. Pour ce qui est de l'ELS, le protocole doit prévoir des épreuves avec et sans activation métabolique à l'aide de témoins positifs et de témoins négatifs adéquats ainsi qu'une exposition de trois à quatre heures. Si les deux traitements de courte durée avec et sans activation métabolique donnent un résultat négatif ou douteux, il faut reprendre avec un traitement continu sans activation métabolique d'environ 24 heures. Une ELS standard doit comprendre : (i) des témoins positifs qui produisent surtout de petites colonies et (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.

En ce qui a trait aux essais sur les cellules de mammifères in vitro, des éléments confirmatoires comme ceux indiqués ci-dessus (p. ex., traitements de différentes durées, épreuves avec et sans activation métabolique) doivent être utilisés. Après de telles épreuves, il n'est pas habituellement justifié d'effectuer des analyses de confirmation plus poussées dans le cas de résultats nettement positifs ou nettement négatifs. Les résultats douteux ou faiblement positifs pourraient valoir la peine de faire une répétition des essais, possiblement en modifiant le protocole au moyen de l'espacement adéquat des concentrations d'essai.

3.3.3 Témoins positifs

Les témoins positifs parallèles sont importants, mais les épreuves sur les cellules de mammifères in vitro pour relever la toxicité génétique sont suffisamment normalisées pour que l'utilisation de témoins positifs se limite généralement à un témoin positif avec activation métabolique (lorsqu'on l'effectue parallèlement à l'épreuve sans activation)

afin de démontrer l'activité du système d'activation métabolique de même que la sensibilité du système d'épreuve.

4. RECOMMANDATIONS POUR LES ÉPREUVES IN VIVO

4.1 Épreuves pour la détection de lésions chromosomiques in vivo

L'analyse des aberrations chromosomiques ou la mesure in vivo des érythrocytes polychromatiques micronucléés dans les cellules de la moelle osseuse conviennent toutes deux pour la détection des clastogènes. Les rats et les souris sont jugés acceptables pour les tests des micronoyaux de la moelle osseuse. On peut aussi effectuer le dénombrement des micronoyaux dans les érythrocytes immatures (polychromatiques) dans le sang périphérique ou dans les réticulocytes nouvellement formés dans le sang de rat (Note 3). De la même façon, on peut utiliser les érythrocytes immatures de n'importe quelle espèce où l'on a démontré une sensibilité adéquate à la détection des clastogènes ou des inducteurs de l'aneuploïdie dans la moelle osseuse ou le sang périphérique (Note 7). On peut utiliser des systèmes d'analyse automatisée (analyse d'image et cytométrie de flux) s'ils sont adéquatement justifiés (OCDE, 1997; Hayashi et coll., 2000; 2007). Les aberrations chromosomiques peuvent aussi être analysées dans les lymphocytes périphériques cultivés à partir de rongeurs traités (Note 11).

4.2 Autres épreuves de génotoxicité in vivo

Les mêmes épreuves in vivo décrites dans la deuxième épreuve de la batterie normalisée (option 2) peuvent être utilisées en tant qu'épreuves de suivi afin de développer le poids de la preuve lors de l'évaluation des résultats d'épreuves in vitro ou in vivo (Notes 11 et 12). Bien que le type d'effet observé in vitro et les connaissances du mécanisme peuvent aider à orienter le choix d'épreuve in vivo, il est impossible d'étudier les aberrations chromosomiques ou les mutations géniques dans les gènes endogènes à l'aide des méthodes normalisées dans la plupart des tissus. Bien que les mutations peuvent être mesurées dans les transgènes chez les rongeurs, cela correspond à un traitement prolongé (p. ex., 28 jours) afin de permettre l'expression, la fixation et l'accumulation de mutations, surtout dans les tissus avec une faible division cellulaire (Note 12). Par conséquent, la deuxième épreuve in vivo évaluera souvent un paramètre sur les lésions causées à l'ADN en tant que substitut. Les épreuves comportant le plus de données et de conseils publiés sur les protocoles comprennent : les épreuves de fracture du brin d'ADN comme l'électrophorèse en gel sur cellule unique (essai de Comet) et l'épreuve par élution alcaline; les épreuves in vivo de mutation transgénique chez les souris et les épreuves de liaison covalente avec l'ADN (lesquelles peuvent toutes être mises en pratique avec de nombreux tissus, Note 12); et l'épreuve de synthèse d'ADN non programmée sur le foie.

4.3 Choix de la dose pour les épreuves in vivo

Habituellement, on analyse trois niveaux de dose (Hayashi et coll., 2005).

4.3.1 Études de courte durée

Pour les études de courte durée (habituellement une à trois administrations), la dose maximale recommandée pour les épreuves de génotoxicité est une dose maximale de 2000 mg/kg, si elle est tolérée, ou une dose maximale tolérée définie (p. ex., pour l'épreuve sur le micronoyau [OCDE]), car une dose qui produit des signes de toxicité fait supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Des recommandations semblables ont été faites en ce qui a trait au test des comètes (Hartmann et coll., 2003) et l'épreuve de mutation transgénique (Heddle et coll., 2000). Il faut aussi tenir compte de la suppression de la production des globules rouges dans la moelle osseuse lorsque l'on choisit la dose. Les doses plus basses sont généralement espacées d'intervalles situés deux à trois fois sous cette valeur.

4.3.2 Études avec administration répétée

Batterie de l'option 1

Lorsque les épreuves in vivo de génotoxicité sont intégrées à une étude de la toxicologie à administration répétée, les doses sont généralement jugées adéquates lorsque l'étude de la toxicologie satisfait aux critères selon lesquels une étude adéquate peut soutenir des essais cliniques chez les humains; ceci peut s'éloigner des critères de sélection de la dose établis dans la directive de l'OCDE sur les tests de micronoyaux in vivo. Ceci s'applique lorsque l'épreuve in vitro sur les cellules de mammifères est négative (ou « positif non pertinent »; voir la section 5).

Études de suivi ou batterie de l'option 2

Lorsque l'on effectue des études de suivi afin d'aborder toute indication de génotoxicité, ou lorsque l'on utilise l'option 2 sans épreuve sur les cellules de mammifères in vitro, il faut évaluer plusieurs facteurs afin de déterminer si la dose maximale est adéquate en matière d'évaluation de la génotoxicité. N'importe lequel des critères énumérés ci-dessous est jugé suffisant pour démontrer que la dose maximale utilisée dans une étude de la toxicologie (typiquement chez le rat) est adéquate pour l'analyse du micronoyau et les autres formes d'évaluation de la génotoxicité :

- i. La dose maximale possible (DMP) en fonction des propriétés physico-chimiques du médicament dans le véhicule (pourvu que la DMP contenue dans ce véhicule soit semblable à celle qui est atteignable par administration aiguë; Note 13).
- ii. Une limite de dose de 1000 milligramme/kilogramme (mg/kg) pour les études de

- 14 jours ou plus, si elle est tolérée.
- iii. l'exposition maximale possible démontrée soit en atteignant un plateau / la saturation dans l'exposition, soit par l'accumulation du composé. Par contraste, la diminution considérable de l'exposition au médicament mère avec le temps (p. ex., diminution de 50 % de l'exposition de départ) peut disqualifier l'étude (à moins qu'un échantillon de sang obtenu au cours des premiers jours soit disponible). Si l'on observe cet effet chez l'un des deux sexes, en général celui qui comporte la diminution de l'exposition ne serait pas mesuré à la fin de l'étude à moins d'exposition rehaussée dans un métabolite d'intérêt.
 - iv. La dose maximale correspond à 0,50 % de la dose maximale qui serait utilisée en cas d'administration aiguë, c'est-à-dire qu'elle se situe près de la dose létale minimale, si de telles données sont disponibles pour d'autres raisons. (La dose maximale en cas d'épreuves sur les micronoyaux à administration aiguë est actuellement décrite dans la directive de l'OCDE comme étant la dose au-dessus de laquelle on peut s'attendre à ce qu'elle soit létale; on donne une orientation semblable (p. ex., Hartmann et coll., 2003) pour d'autres épreuves in vivo.)

Le choix d'une dose maximale fondé seulement sur une marge d'exposition (expositions multiples par rapport à cliniques) sans toxicité n'est pas jugé une justification suffisante.

4.3.3 Composés toxiques pour le sang ou la moelle osseuse mis à l'essai

De nombreux composés qui entraînent une aneuploïdie, comme les puissants poisons du fuseau, ne peuvent être mis en évidence que lors d'épreuves in vivo sur le micronoyau dans la moelle osseuse ou le sang dans une gamme étroite de doses d'un niveau presque toxique. C'est également le cas pour certains agents clastogènes. Si les données toxicologiques indiquent une toxicité grave de la lignée des globules rouges (p. ex., suppression marquée des érythrocytes polychromatiques ou des réticulocytes), les doses mesurées ne doivent pas être plus de deux fois inférieures à la dose cytotoxique maximale. Si des doses adéquates ne sont pas comprises dans une étude de plusieurs semaines, des données supplémentaires pouvant contribuer à la mise en évidence des aneugènes et de certains clastogènes toxiques pourraient être tirées de l'un des procédés suivants :

- i. Un échantillonnage précoce du sang (après trois ou quatre jours) est souhaitable lorsque l'on observe des augmentations marquées de la toxicité au fur et à mesure du traitement. Par exemple, lorsque l'on utilise du sang ou de la moelle osseuse pour mesurer les micronoyaux lors d'une étude de plusieurs semaines (p. ex., 28 jours), et que l'on mesure les réticulocytes, une hématotoxicité marquée peut avoir une incidence sur la capacité à mettre en évidence les micronoyaux; c.-à-d. qu'une dose qui entraîne une augmentation détectable de micronoyaux après un traitement aigu pourrait être trop

- toxique à analyser après plusieurs traitements (Hamada et coll., 2001). L'échantillon précoce peut être utilisé pour fournir l'assurance que les clastogènes et les aneugènes éventuels sont mis en évidence (mais consulter les Notes 14 et 15).
- ii. Une épreuve in vitro sur les micronoyaux des cellules de mammifères.
 - iii. Une épreuve aigüe sur les micronoyaux de la moelle osseuse.

4.4 Démonstration de l'exposition des tissus cibles pour les résultats des essais in vivo

Les essais in vivo jouent un rôle important dans les stratégies d'étude de la génotoxicité. La valeur des résultats d'essais in vivo est liée directement à la démonstration d'une exposition adéquate du tissu cible au composé mis à l'essai. Tel est le cas, en particulier, des résultats négatifs des tests in vivo et des tests in vitro qui laissent voir des indices convaincants de génotoxicité, ou lorsque l'on n'utilise aucun essai in vitro sur les cellules de mammifères. Les preuves d'exposition adéquate pourraient comprendre la toxicité dans le tissu en question, ou des données toxicocinétiques telles qu'elles sont décrites dans la section suivante.

4.4.1 Lorsqu'un essai de la génotoxicité in vitro est positif (ou n'est pas effectué)

L'évaluation de l'exposition in vivo doit être effectuée à la dose maximale ou à une autre dose significative en utilisant les mêmes espèces ou les mêmes souches ainsi que la même voie d'administration que celles de l'essai de la génotoxicité. Lorsque la génotoxicité est mesurée dans les essais de la toxicologie, les renseignements sur l'exposition sont généralement disponibles dans le cadre de l'évaluation de la toxicologie.

La démonstration de l'exposition in vivo devrait être faite par l'une ou l'autre des mesures suivantes :

- i. Cytotoxicité :
 - a. Pour les épreuves cytogénétiques : En obtenant un changement sensible de la proportion des érythrocytes immatures, par rapport au nombre total d'érythrocytes dans le tissu utilisé (moelle osseuse ou sang) aux concentrations et aux temps d'échantillonnage utilisés dans le test du micronoyau ou par la mesure d'une réduction sensible de l'index mitotique dans le cas de l'essai sur les aberrations chromosomiques.
 - b. Pour les autres essais de la génotoxicité in vivo : La toxicité dans le foie ou le tissu faisant l'objet de l'évaluation, p. ex., par évaluation histopathologique ou par indicateurs de toxicité dans la biochimie sanguine.
- ii. Exposition :
 - a. Mesure des substances médicamenteuses présentes dans le sang ou le plasma. La moelle osseuse est un tissu bien perfusé et le niveau de substances présentes dans le sang ou dans le plasma et qui sont liées à la posologie est généralement semblable à

celui observé dans la moelle osseuse. On s'attend à ce que le foie soit exposé pour ce qui est des médicaments avec exposition systémique peu importe la voie d'administration.

- b. La mesure directe des substances médicamenteuses présentes dans le tissu cible, ou l'évaluation autoradiographiques de l'exposition du tissu.

Si l'exposition systémique est semblable à l'exposition clinique prévue ou qu'elle est plus basse, on peut faire appel à des stratégies de rechange comme :

- i. L'utilisation d'une différente voie d'administration.
- ii. L'utilisation d'une espèce différente avec une exposition plus élevée.
- iii. L'utilisation d'un tissu ou d'un essai différent (consulter la section 2.3.4, « Limites des épreuves in vivo normalisées »).

Si l'on ne peut réaliser des conditions d'exposition adéquates (p. ex., avec des composés présentant une disponibilité très mauvaise pour le tissu cible), les essais classiques de génotoxicité in vivo risquent de ne pas être très utiles.

4.4.2 Lorsque les résultats des essais in vitro sont négatifs

Si les essais in vitro ne présentent aucun potentiel génotoxique, on peut évaluer l'exposition (systémique) in vivo à l'aide de n'importe quelle méthode décrite ci-dessus, ou on peut la déduire à partir des résultats des études normales effectuées sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion chez les rongeurs à d'autres fins.

4.5 Temps d'échantillonnage pour les essais in vivo

Le choix du temps d'échantillonnage des essais in vivo du micronoyaux, des aberrations chromosomiques et UDS doit respecter l'OCDE (1997).

Lorsque l'analyse du micronoyau est intégrée aux études de plusieurs semaines, on peut effectuer un échantillonnage du sang ou de la moelle osseuse la journée suivant l'administration ultime (consulter la recommandation ayant trait au temps d'échantillonnage supplémentaire du sang ci-dessus).

En ce qui a trait aux autres essais de génotoxicité, le temps d'échantillonnage doit être adéquat en fonction du paramètre mesuré; par exemple, les mesures des dommages causés à l'ADN/cassure de l'ADN sont habituellement effectuées quelques heures (p. ex., de deux à six) après la dernière administration en ce qui a trait à l'administration quotidienne multiple. Dans le

cas d'une administration unique, deux temps d'échantillonnages doivent être utilisés : l'un quelques heures après le traitement, et l'autre après 24 heures.

En principe, des études de n'importe quelle durée peuvent être jugées adéquates pourvu que la dose / l'exposition maximale convienne.

4.6 Nombre d'animaux analysés

Le nombre d'animaux analysés est déterminé par les recommandations actuelles en ce qui a trait à l'essai du micronoyau (OCDE) ou les autres essais de génotoxicologie et ne comprennent habituellement pas les animaux traités pour une étude de toxicologie. Les animaux utilisés pour les analyses de la génotoxicité doivent être choisis au hasard parmi le groupe utilisé pour faire l'étude de toxicologie.

4.7 Utilisation de rongeurs mâles ou femelles pour les tests de génotoxicité in vivo

Si les essais doivent porter sur des médicaments spécifiques au sexe, on utilisera des animaux du sexe correspondant.

Les essais in vivo utilisant le protocole aigu peuvent généralement être effectués chez un seul sexe. En ce qui a trait aux essais aigus, on ne devrait tenir compte des deux sexes que si les données portant sur la toxicité, le métabolisme ou l'exposition (C_{\max} ou SSC) indiquent une différence importante sur le plan toxicologique entre les sexes chez l'espèce utilisée. Autrement, on pourra se contenter de mâles pour les essais aigus de génotoxicité. Lorsque l'on intègre le test de génotoxicité dans une étude de toxicologie à doses multiples chez les deux sexes, on peut obtenir des échantillons provenant des deux sexes, mais on ne peut mesurer qu'un seul sexe s'il n'existe aucune différence évidente entre leur toxicité ou leur métabolisme. Le niveau de doses pour le ou les sexes mesurés doit satisfaire les critères concernant les niveaux de dose adéquats (consulter les sections 4.3.2 et 4.3.3).

Des principes semblables peuvent être appliqués pour les autres essais de génotoxicité in vivo.

4.8 Voie d'administration

La voie d'administration est généralement la voie d'administration clinique prévue, p. ex., orale, intraveineuse ou sous-cutanée, mais elle peut être modifiée s'il le faut afin d'obtenir une exposition systémique, p. ex., pour les composés appliqués sur la peau (consulter la section 2.3.4).

4.9 Utilisation des témoins positifs dans les études in vivo

Pour ce qui est des études in vivo, on juge qu'il est suffisant de traiter les animaux avec un témoin positif de façon seulement périodique, et non parallèle à chaque essai, après qu'un laboratoire ait établi sa compétence quant à l'utilisation de l'essai (Note 16).

5 CONSEILS SUR L'ÉVALUATION DES RÉSULTATS DE TESTS ET DES STRATÉGIES DE SUIVI

Les essais comparatifs ont montré d'une manière concluante que chaque système d'essais in vitro engendre à la fois des résultats négatifs et faux positifs en ce qui a trait à la prévision de la cancérogénicité pour les rongeurs. Les batteries de tests de génotoxicité (in vitro et in vivo) permettent la détection des cancérogènes que l'on soupçonne d'agir principalement par l'intermédiaire d'un mécanisme comportant des dommages génétiques directs, comme c'est le cas pour la majorité des cancérogènes humains connus. Par conséquent, ces tests ne pourront détecter les cancérogènes non génotoxiques. Certaines conditions expérimentales (p. ex., la capacité limitée des systèmes d'activation métabolique in vitro) peuvent également conduire à des résultats faux négatifs avec les tests in vitro. Le recours à une batterie de tests est destiné à réduire les risques de résultats faux négatifs pour les composés qui présentent des risques de génotoxicité. Toutefois, un résultat positif obtenu dans un essai quelconque de génotoxicité ne signifie pas nécessairement que le composé en question pose un risque génotoxique ou cancérogène pour les humains.

Bien que les données positives in vitro puissent indiquer les propriétés génotoxiques intrinsèques d'un médicament, des données in vivo adéquates déterminent la signification biologique de ces signaux in vitro dans la plupart des cas. Aussi, parce qu'il existe plusieurs mécanismes indirects de génotoxicité qui n'opèrent qu'au-dessus de certaines concentrations, il est possible d'établir un niveau sécuritaire (seuil) pour les catégories de médicaments à l'aide de preuves pour de tels mécanismes (consulter 5.2 ci-dessous, Müller et Kasper, 2000; Scott et coll., 1991; Thybaud et coll., 2007).

5.1 Évaluation de la pertinence biologique

Les recommandations ci-dessous supposent que le test a été effectué en utilisant un espacement des doses, des niveaux de toxicité, etc. adéquats.

Les légères augmentations dans la génotoxicité apparente in vitro ou in vivo doivent d'abord être évaluées pour en déterminer la reproductibilité et l'importance biologique. Les exemples de résultats qui ne sont pas jugés significatifs biologiquement comprennent :

- i. Les légères augmentations qui sont statistiquement significatives comparativement aux valeurs de contrôle ou négatives, mais qui se trouvent dans les intervalles de confiance des valeurs historiques adéquates de l'établissement.
- ii. Réponses faibles ou douteuses qui ne sont pas reproductibles.

Si ni l'une, ni l'autre des conditions ci-dessus ne s'applique, le poids de la preuve indique une absence de potentiel génotoxique, et le test est jugé négatif ou les conclusions ne sont pas biologiquement pertinentes, ce qui rend inutile toute autre forme de test.

5.2 Évaluation des résultats obtenus dans les essais *in vitro*

Lors de l'évaluation des résultats d'essais positifs, surtout en ce qui a trait à l'épreuve de mutagenèse microbienne, il faut tenir compte de la pureté du composé mis à l'essai afin de déterminer si le résultat positif pourrait être attribué à un contaminant.

5.2.1 Évaluation des résultats positifs obtenus *in vitro* lors d'une épreuve de mutation bactérienne

Puisqu'on associe les résultats positifs dans l'épreuve d'Ames à la réactivité de l'ADN, des épreuves approfondies de suivi seraient justifiées afin d'évaluer le risque mutagène et cancérigène, à moins d'indication contraire suite à une analyse adéquate des avantages et des risques.

Il existe quelques exemples bien caractérisés d'augmentations artéfactuelles dans des colonies qui ne sont pas réellement des révertants. Ceux-ci peuvent se produire en raison de contamination avec les acides aminés (c.-à-d. qui fournissent de l'histidine aux souches de *Salmonella typhimurium* ou le tryptophane pour les souches *Escherichia coli*), de sorte que l'épreuve de mutation inverse sur bactéries n'est pas adéquate pour la mise à l'essai d'un peptide ayant de fortes chances de se dégrader. Il existe aussi certains cas où les résultats positifs obtenus lors d'une épreuve de mutation bactérienne peuvent ne pas indiquer un potentiel génotoxique *in vivo* chez les humains, par exemple lorsqu'un métabolisme propre aux bactéries se déclenche, comme l'activation par nitroréductase bactériennes.

5.2.2 Évaluation des résultats positifs obtenus *in vitro* lors d'épreuves sur les cellules de mammifères

Les recommandations portant sur l'évaluation du poids de la preuve et les essais de suivis pour les résultats de génotoxicité positifs font l'objet d'une discussion dans les rapports des [IWGT] (p. ex., Thybaud et coll., 2007). De plus, la documentation scientifique énumère un certain nombre de conditions qui peuvent conduire à un résultat positif

douteux lors d'un test in vitro. Par conséquent, tout résultat positif in vitro doit être évalué selon un examen du poids de la preuve, comme on l'indique ci-dessous. Cette liste n'est pas exhaustive; elle n'est fournie qu'à titre d'aide à la prise de décisions.

- i. Les conditions n'apparaissent pas in vivo (pH; osmolalité; précipités). (Remarquez que la limite de 1 mM évite les augmentations de l'osmolalité; et que si le composé mis à l'essai modifie le pH, il est indiqué d'ajuster le pH au pH normal des cultures non traitées au moment du traitement.)
- ii. L'effet ne se manifeste qu'aux concentrations les plus toxiques.

Lors de l'ELS, des augmentations situées à $\geq 80\%$ au GRT.

Pour les épreuves cytogénétiques in vitro, lorsque la croissance est réduite de $\geq 50\%$.

Si l'une des conditions ci-dessus s'applique, le poids de la preuve indique une absence de potentiel génotoxique; on peut alors suivre la batterie d'épreuves normalisées (option 1). Par conséquent, un seul essai in vivo est jugé suffisant.

5.2.3 Évaluation des résultats négatifs in vitro

En ce qui a trait aux résultats in vitro négatifs, il faut songer à effectuer d'autres tests lors de circonstances particulières, comme (les exemples fournis ne sont pas exhaustifs; ils ne sont fournis qu'à titre d'aide à la prise de décisions) : la structure ou le métabolisme connu du composé indique que les méthodes normales d'activation métabolique in vitro (p. ex., foie de rongeur S9) pourraient s'avérer inadéquates; la structure ou l'activité connue du composé laisse croire que d'autres méthodes ou systèmes d'essais pourraient être plus appropriés.

5.3 Évaluation des résultats obtenus dans les essais in vivo

Les essais in vivo présentent l'avantage de tenir compte de l'absorption, la distribution et l'excrétion, trois aspects importants lorsque l'on envisage l'utilisation de composés chez les humains. En outre, le métabolisme risque de jouer un rôle plus important in vivo, comparativement aux systèmes normalement utilisés in vitro. Si les résultats in vivo et in vitro sont contradictoires, il conviendra d'examiner et d'expliquer les différences observées au cas par cas, p. ex., une différence de métabolisme; excrétion rapide et efficace d'un composé in vivo.

Les épreuves de génotoxicité in vivo ont aussi la possibilité de donner des résultats positifs trompeurs qui n'indiquent pas une génotoxicité réelle. Par exemple :

- i. Des augmentations des micronoyaux peuvent se présenter sans administration d'un agent génotoxique en raison de perturbations dans l'érythropoïèse (Tweats et coll., 2007, I).
- ii. Les données sur l'aduit d'ADN doivent être interprétées à la lumière du niveau actuel d'addition endogène.
- iii. Les effets indirects liés à la toxicité pourraient influencer les résultats des essais sur les cassures de l'ADN (p. ex., élution alcaline et test des comètes).

Par conséquent, il est important de tenir compte de toutes les conclusions toxicologiques et hématologiques lorsque l'on évalue les données sur la génotoxicité (Note 15). Les effets indirects reliés aux changements toxicologiques pourraient avoir une marge de sécurité et donc ne pas être pertinents sur le plan clinique.

5.4 Stratégies de suivi pour les résultats positifs

5.4.1 Suivi des conclusions tirées des tests *in vitro* sur les cellules de mammifères

La discussion qui suit suppose que les résultats de l'épreuve de mutation bactérienne d'Ames sont négatifs.

5.4.1.1 Suivi mécaniste et *in vivo*

Lorsque le poids de la preuve est insuffisant pour indiquer un manque de pertinence, les mesures de suivi recommandées en matière d'épreuves positives sur les cellules de mammifères seraient de fournir des preuves expérimentales, soit en ajoutant des études *in vitro* (i, ci-dessous) **ou** en effectuant deux épreuves *in vivo* adéquates (ii, ci-dessous) comme suit :

- i. Les renseignements mécanistes qui contribuent au poids de la preuve en ce qui a trait à l'absence de génotoxicité sont souvent générés *in vitro*, par exemple, les preuves qu'un composé mis à l'essai qui comprend des aberrations chromosomiques ou des mutations lors de l'ELS n'est pas un agent dommageable pour l'ADN (p. ex., d'autres tests de mutation ou de dommage à l'ADN négatifs en plus de l'épreuve d'Ames; considérations structurelles), ou des preuves d'un mécanisme indirect qui pourrait ne pas être pertinent *in vivo* ou qui pourrait avoir un seuil (p. ex., inhibition de la synthèse de l'ADN, espèces réactives de l'oxygène produites seulement à des concentrations élevées) (Galloway et coll., 1998; Scott et coll., 1991; Müller et Kasper, 2000). On peut utiliser des études semblables pour faire un suivi d'un résultat positif lors de l'épreuve *in vitro* sur le micronoyau, ou dans ce cas, les preuves peuvent comprendre un mécanisme connu qui indique une perte chromosomique ou une aneuploïdie, ou encore des expériences de coloration du centromère (Note 17) qui indiquent une perte de chromosomes. Les polyplœidies sont courantes dans les

épreuves d'aberrations chromosomiques in vitro. Alors que les aneugènes peuvent entraîner une polyploïdie, cela n'indique pas forcément un potentiel aneugène et peut simplement indiquer des perturbations du cycle cellulaire; on l'associe aussi souvent à une augmentation de la cytotoxicité. Si on observe une polyploïdie, mais aucun brr chromosomique lors d'une épreuve in vitro, en général une épreuve in vivo négative sur le micronoyau démontrant une exposition adéquate fournirait une assurance suffisante de l'absence de potentiel inducteur d'aneuploïdie.

Si l'information mécanistique ci-dessus et le poids de la preuve appuient l'absence de génotoxicité pertinente, un seul test in vivo accompagné de preuves appropriées de l'exposition est nécessaire afin d'établir l'absence d'activité génotoxique. Il s'agit ordinairement d'une épreuve cytogénétique, et l'épreuve sur le micronoyau in vivo convient lorsque l'on fait un suivi du potentiel de perte chromosomique.

En l'absence d'un poids de la preuve ou de renseignements mécanistiques suffisants afin d'exclure le potentiel génotoxique pertinent, deux tests in vivo conviennent généralement, accompagnés des paramètres appropriés et dans les tissus adéquats (habituellement deux tissus différents), en mettant l'accent sur l'obtention d'une exposition adéquate dans les modèles in vivo.

Ou

- ii. Faire deux épreuves adéquates in vivo, habituellement sur des tissus différents, en faisant la preuve de l'exposition.

En résumé, des résultats négatifs dans des épreuves in vivo appropriées accompagnés d'une justification adéquate des paramètres mesurés et d'une démonstration de l'exposition (consulter la section 4.4.1) sont jugés suffisants pour démontrer l'absence de risque génotoxique important.

5.4.1.2 Suivi d'un résultat in vitro positif dépendant d'une activation S9

Lorsque l'on n'observe des résultats positifs que dans la présence d'un système d'activation S9, on doit premièrement vérifier que l'activation métabolique en est responsable et non une différence quelconque dans les conditions (p. ex., peu ou pas de sérum dans le mélange S9, comparativement à 0,10 % de sérum dans les incubations non activées). La stratégie de suivi vise alors à déterminer la pertinence des résultats in vitro par rapport aux conditions in vivo et mettra l'accent en général sur les études in vivo dans le foie (Note 18).

5.4.2 Suivi d'une épreuve positive sur le micronoyau in vivo

S'il y a une augmentation des micronoyaux in vivo, toutes les données toxicologiques doivent être évaluées afin de déterminer si un effet non génotoxique pourrait en être la cause ou un facteur contributif (Note 15). Si l'on soupçonne des effets d'érythropoïèse ou de physiologie perturbée (comme hypo/hyperthermie), une épreuve in vivo d'aberrations chromosomiques pourrait être plus appropriée. Si l'on soupçonne une augmentation « réelle », on doit utiliser des stratégies afin de démontrer si l'augmentation est due à une perte ou à un bri chromosomique (Note 17). Il existe des preuves que l'induction d'une aneuploïdie, p. ex., au moyen de poisons du fuseau, suit une dose-réponse non linéaire. Par conséquent, il peut être possible de déterminer qu'il existe un seuil d'exposition sous lequel on ne prévoit pas de perte chromosomique, mais aussi de déterminer s'il existe une marge de sécurité adéquate comparativement à l'exposition clinique.

En conclusion, l'évaluation du potentiel génotoxique d'un composé doit tenir compte de la totalité des conclusions et reconnaître les valeurs et les limites intrinsèques des tests in vitro et in vivo.

5.5 Épreuve de génotoxicité de suivi par rapport aux phénomènes tumorigènes observés lors des bioessais sur la cancérogénicité

On peut mener d'autres tests sur la génotoxicité dans les modèles adéquats pour ce qui est des composés qui étaient négatifs lors de la batterie d'épreuves normalisées, mais qui ont présenté des augmentations des tumeurs lors des bioessais de cancérogénicité sans disposer de preuves suffisantes pour établir un mécanisme non génotoxique. Afin de comprendre le mode d'action, les tests supplémentaires peuvent comprendre des conditions modifiées pour l'activation métabolique dans les tests in vitro ou peuvent comprendre des tests in vivo pour mesurer les dommages génétiques dans les organes cibles des agents tumorigènes, comme les essais sur les cassures de l'ADN (p. ex., épreuves de Comet ou d'élution alcaline), les tests UDS sur le foie, la liaison covalente de l'ADN (p. ex., par postmarquage au ³²P), l'induction de mutations dans des transgènes, ou la caractérisation moléculaire des changements génétiques dans les gènes liés à des phénomènes tumoraux (Kasper et coll., 2007).

6. NOTES

1. L'épreuve in vitro de micronoyau a été grandement évaluée dans le cadre d'études collaboratives internationales (Kirsch-Volders et coll., 2003), est validée par l'ECVAM (Corvi et coll., 2008) et fait l'objet d'une directive de l'OCDE 487 (2010).
2. Un nombre limité, mais non négligeable, de produits cancérogènes dont les propriétés génotoxiques sont toujours mises en évidence dans les épreuves sur moelle osseuse

révélant des lésions chromosomiques ont donné des résultats négatifs, douteux ou contradictoires dans deux des épreuves in vitro de la batterie normalisée. Des substances cancérogènes comme la procarbazine, l'hydroquinone, l'uréthane et le benzène appartiennent à ce groupe. Quelques autres exemples tirés d'une étude effectuée auprès de compagnies sont décrits par Tweats et coll., 2007, II.

3. En principe, les micronoyaux présents dans les cellules hématopoïétiques peuvent être évalués dans la moelle épinière de n'importe quelle espèce, et dans le sang d'espèces qui ne filtrent pas les érythrocytes micronucléés qui circulent dans la rate. Chez les souris de laboratoire, on peut mesurer les micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques présents dans le sang, et les érythrocytes matures (normochromatiques) peuvent être utilisés lorsque les souris sont traitées de façon continue pendant environ 4 semaines ou plus. Bien que les rats éliminent rapidement les érythrocytes micronucléés de leur circulation, on a établi que l'induction du micronoyau par une gamme de clastogènes et d'aneugènes peut être mise en évidence dans les réticulocytes du sang de rat (Wakata et coll., 1998; Hamada et coll., 2001). Le sang de rat peut être utilisé pour faire l'analyse du micronoyau pourvu que des méthodes soient utilisées afin de s'assurer que les réticulocytes nouvellement formés soient analysés (Hayashi et coll., 2007; MacGregor et coll., 2006) et que la taille d'échantillon soit suffisamment grande pour fournir une sensibilité statistique adéquate compte tenu des niveaux plus bas de micronoyaux dans le rat de rat que dans la moelle osseuse (Kissling et coll., 2007). Peu importe la méthode choisie, la moelle osseuse ou le sang, l'analyse manuelle ou automatisées, chaque laboratoire doit déterminer l'échantillon minimal adéquat afin de s'assurer que les erreurs de mesure restent inférieures à la variation d'un animal à l'autre.

Certaines connaissances sont à présent disponibles sur l'induction du micronoyau chez le chien et le singe rhésus (Harper et coll., 2007; Hotchkiss et coll., 2008). Une situation où l'une de ces espèces substitue pourrait être utile sera dans l'évaluation d'un métabolite humain qui n'était pas suffisamment représenté chez les rongeurs, mais qui s'est formé chez le chien ou le singe.

4. Bien que les deux possibilités de la batterie soient aussi adéquates l'une que l'autre, des connaissances spécifiques quant à un composé mis à l'essai en particulier peut indiquer qu'une option est préférable à l'autre. Par exemple, si l'exposition systémique dans les modèles animaux est égale ou inférieure à l'exposition clinique prévue, on doit utiliser des épreuves in vitro : option 1 (consulter aussi les sections 2.3.4 et 4.4.1). D'un autre côté, on recommande l'option 2, qui comprend un test sur le foie, lorsque l'on s'attend à ce que des métabolites réactifs à courte vie soient générés dans le foie.
5. On a déterminé l'existence d'une relation causale entre certains groupements à structure indicatrice et le potentiel cancérogène 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 (Ashby et Paton, 1994). 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).
6. Il existe certaines connaissances quant aux épreuves *in vivo* d'induction du micronoyau dans la peau et le côlon (Hayashi et coll., 2007), et des épreuves de dommages à l'ADN de ces tissus peuvent aussi constituer un substitut approprié.
 7. Certains produits chimiques sont plus facilement détectés par incorporation directe ou par préincubation, quoique les différences sont habituellement quantitatives plutôt que qualitatives (Gatehouse et coll., 1994). Les expériences faites dans l'industrie pharmaceutique où les médicaments ont été testés selon les deux protocoles n'ont pas donné de résultats différents pour les deux méthodes, et, dans le rapport des [IWGT] (Gatehouse et coll., 1994), les exemples de catégories chimiques décrites comme étant les plus facilement détectables par préincubation ne sont pas en général des produits pharmaceutiques et sont positifs lors des tests de génotoxicité *in vivo* dans le foie. Celles-ci comprennent nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes (p. ex., le formaldéhyde, le crotonaldéhyde), les colorants azoïques (p. ex., jaune beurre), les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les composés allyliques (isothiocyanate d'allyle, chlorure d'allyle) et nitrés (aromatiques, aliphatiques).
 8. La justification pour une concentration maximale de 1 mM pour les essais *in vitro* sur les cellules de mammifères comprend les éléments suivants : la batterie comprend l'épreuve d'Ames et une épreuve *in vivo*. Cette batterie optimise la mise en évidence des cancérogènes génotoxiques sans se fier à un seul essai en particulier. Il existe une très faible probabilité que les composés ciblés (les cancérogènes qui endommagent l'ADN) ne sont pas détectés dans l'épreuve d'Ames ou dans l'épreuve *in vivo* de génotoxicité, mais qui peuvent être mis en évidence lors d'une épreuve *in vitro* sur les cellules de mammifères à des concentrations supérieures à 1 mM. Deuxièmement, une limite de 1 mM maintient l'élément de détermination des dangers, étant plus élevé que les expositions cliniques à des produits pharmaceutiques connus, y compris ceux qui se concentrent dans les tissus (Goodman et Gilman, 2001), et est aussi plus élevée que les niveaux normalement atteignables dans les études précliniques *in vivo*. Il est connu que certains médicaments nécessitent des expositions cliniques très élevées pour obtenir un effet thérapeutique, p. ex., les analogues de nucléosides et certains antibiotiques. Bien qu'une comparaison de la

capacité avec les médicaments existants puisse être d'un intérêt particulier pour les fabricants, peut-être même au-dessus de la limite de 1 mM, en fin de compte, ce sont les tests in vivo qui déterminent la pertinence quant à l'innocuité humaine. Pour les produits pharmaceutiques dont la masse moléculaire est exceptionnellement faible (p. ex., moins de 200), on doit songer à faire des tests à des concentrations plus élevées.

9. Bien que certains cancérigènes génotoxiques soient impossibles à détecter avec les essais de génotoxicité in vitro à moins que les concentrations testées n'induisent un certain degré de cytotoxicité, les agents qui endommagent l'ADN peuvent généralement être détectés à des niveaux de toxicité modérés seulement (Greenwood et coll., 2004). Au fur et à mesure que la cytotoxicité augmente, des mécanismes autres que des dommages directs à l'ADN par un composé ou ses métabolites peuvent mener à des résultats « positifs » qui sont liés à la cytotoxicité et non à la génotoxicité. Une telle induction indirecte de dommages à l'ADN secondaire aux dommages faits aux cibles autres que l'ADN est plus susceptible de se produire au-dessus d'un certain seuil de concentration. On ne s'attend pas à ce que la perturbation des processus cellulaires se déroule à des concentrations pharmacologiquement pertinentes plus basses.

Lors des épreuves cytogénétiques, même les clastogènes faibles qui sont des cancérigènes connus sont positifs sans dépasser une diminution de 50 % du compte de cellules. D'un autre côté, les composés qui n'endommagent pas l'ADN, et qui ne sont ni mutagènes ni cancérigènes peuvent provoquer des bris chromosomiques aux concentrations toxiques. En ce qui a trait aux deux épreuves cytogénétiques in vitro, l'épreuve d'aberration chromosomique et l'épreuve du micronoyau in vitro, on considère qu'une limite de 50 % de diminution de la croissance convient.

Pour les épreuves cytogénétiques dans les lignées cellulaires, on a montré que mesurer la population de cellules au fil du temps en mesurant le changement dans le nombre de cellules durant la culture en ce qui a trait au témoin, p. ex., en utilisant la méthode que l'on appelle doublement de la population (DP; Note 10), est une mesure utile de la cytotoxicité, car il est connu que le nombre de cellules peut sous-estimer la toxicité. Pour ce qui est des cultures de lymphocytes, une inhibition de la prolifération ne dépassant pas environ 50 % est jugée suffisante; on peut la mesurer en utilisant l'index mitotique (IM) pour ce qui est des épreuves d'aberrations en métaphase et par un index fondé sur le blocage de la cytotinèse pour ce qui est des épreuves du micronoyau in vitro. De plus, pour les épreuves du micronoyau in vitro, puisque les micronoyaux sont mesurés dans l'interphase suivant une division mitotique, il est important de vérifier que les cellules ont progressé à travers le cycle cellulaire. Cela peut être fait en utilisant la cytochalasine B pour permettre la division nucléaire, mais pas la division cellulaire, afin que les micronoyaux puissent être mesurés dans les cellules binucléées (la méthode de choix pour les lymphocytes). Pour les lignées cellulaires, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour démontrer la prolifération

cellulaire, notamment la croissance de la population cellulaire au fil du temps (DP), ainsi qu'il est décrit ci-dessus (Kirsch-Volders et coll., 2003).

Pour l'ELS, on atteint la sensibilité appropriée en limitant la concentration maximale à près de 20 % de croissance totale relative (CTR) (de 10 à 20 %) pour la méthode en gélose molle et pour la méthode de micropuits (Moore et coll., 2002). Les examens des données publiées en utilisant les critères actuels ont trouvé très peu de produits chimiques qui étaient positifs dans l'ELS, mais seulement à des concentrations de moins de 20 % de CTR et qui étaient des cancérigènes pour les rongeurs. De plus, il manque des preuves convaincantes de cancérogenèse génotoxique pour cette catégorie. Le consensus est qu'il est approprié de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats lorsque l'on n'observe des augmentations de mutation qu'en dessous de 20 % de CTR, et un résultat ne serait pas jugé positif si l'augmentation de la fraction mutante ne s'est produite qu'à ≤ 10 % de CTR.

En conclusion, il est approprié de faire preuve de prudence lorsque l'on interprète les résultats positifs obtenus si la diminution en croissance/survie approche ou dépasse 50 % pour les épreuves cytogénétiques ou 80 % pour l'ELS. On reconnaît que l'évaluation de cellules traitées à ces niveaux de cytotoxicité/survie des clones peut entraîner une plus grande sensibilité, mais comporte un risque plus élevé de résultats positifs non pertinents. Le recours à une batterie pour la génotoxicité est conçu pour garantir une sensibilité adéquate sans se fier seulement à des tests sur les cellules de mammifères in vitro à cytotoxicité élevée.

Afin d'obtenir une gamme de toxicité appropriée, il est utile de faire une épreuve de délimitation d'une plage de valeur dans une vaste gamme de concentrations, mais lors de l'épreuve de génotoxicité, il est souvent crucial d'utiliser de multiples concentrations qui sont très près l'une de l'autre (moins du double de dilution). D'autres concentrations peuvent être mises à l'essai, mais il n'est pas nécessaire d'évaluer toutes les concentrations en ce qui a trait à la génotoxicité. On ne s'attend pas à ce que de multiples expériences soient effectuées afin d'atteindre une diminution exacte de 50 % en croissance, par exemple, ou une diminution d'exactly 80 % de la CTR.

10. Pour les épreuves cytogénétiques in vitro, il convient d'utiliser une mesure de croissance cellulaire relative pour évaluer la toxicité, parce que le dénombrement cellulaire peut sous-estimer la toxicité (Greenwood et coll., 2004). En utilisant des doublements calculés de la population (consulter le glossaire) pour estimer le niveau de diminution de la croissance de 50 %, il a été démontré que la fréquence des résultats positifs avec les composés qui ne sont pas mutagènes ou cancérigènes est diminuée, alors que les agents qui agissent au moyen d'interaction avec l'ADN sont fiables lorsqu'ils sont positifs.

11. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner les aberrations chromosomiques à l'étape de la métaphase dans les lymphocytes cultivés à partir d'animaux testés après une ou plusieurs administrations du composé mis à l'essai, tout comme les cellules en métaphase de la moelle osseuse peuvent être utilisées. Puisque les lymphocytes en circulation ne se répliquent pas, on ne s'attend pas à ce que les agents qui nécessitent une duplication quant à leur effet génotoxique (p. ex., certains analogues de nucléosides) soient détectés dans ce type de cellule. Puisque certains lymphocytes ont une vie relativement longue, en principe, la possibilité existe que l'accumulation de dommages à l'ADN non réparé *in vivo* donnerait lieu à des aberrations lorsque les cellules sont stimulées à se diviser *in vitro*. L'épreuve *in vivo* sur les lymphocytes peut être utile pour faire un suivi d'indices de clastogénicité, mais en général un autre tissu comme le foie est un supplément plus informatif à l'épreuve du micronoyau dans les cellules hématopoïétiques parce que l'exposition au médicament et aux métabolites est souvent plus élevée dans le foie.
12. L'inclusion d'une deuxième épreuve *in vivo* dans la batterie sert à fournir l'assurance d'une absence de génotoxicité en utilisant un tissu qui est bien exposé au médicament ou à ses métabolites; un petit nombre de cancérigènes qui sont jugés génotoxiques ont donné des résultats positifs dans un test sur le foie, mais étaient négatifs dans un test de la cytogénétique dans la moelle osseuse. Ces exemples reflètent probablement l'absence d'une activité métabolique adéquate ou une absence des produits intermédiaires réactifs donnés aux cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse.

Les épreuves sur les cassures d'ADN, les adduits d'ADN et les mutations dans les transgènes ont l'avantage de pouvoir être appliqués à bien des tissus. Il n'existe pas encore de protocoles reconnus à l'échelle internationale pour toutes les épreuves *in vivo*, bien qu'il existe une grande quantité de connaissances et de données publiées, ainsi que de recommandations quant aux méthodes pour les épreuves sur les cassures d'ADN (le test des comètes et élution alcaline), les mesures d'adduits d'ADN (liaison covalente) et les épreuves de mutations transgéniques sur les rongeurs en plus de l'épreuve UDS. En ce qui a trait à un composé qui est positif *in vitro* lors de l'ELS et entraîne de grandes colonies, mais qui n'entraîne pas de bris chromosomiques lors d'une épreuve *in vitro* sur les métaphases, il convient de favoriser une épreuve *in vivo* pour les mutations, comme l'épreuve de mutation génétique des souris transgéniques plutôt qu'une épreuve sur les cassures d'ADN. On considère que l'épreuve UDS est utile principalement pour les composés qui provoquent des adduits d'ADN importants ou qui sont positifs dans l'épreuve d'Ames. Puisque la cytotoxicité provoque des cassures de l'ADN, il faut faire une évaluation prudente de la cytotoxicité afin d'éviter de confondre les résultats des épreuves de cassures de l'ADN. Ceci a bien été caractérisé pour ce qui est de l'épreuve d'élution alcaline *in vitro* (Storer et coll., 1996), mais n'a pas été complètement validé pour l'épreuve de Comet. En principe, les épreuves de cassure de l'ADN peuvent être utilisées

dans les épreuves de toxicologie à doses répétées au moyen de niveaux de dose et de temps d'échantillonnage adéquats.

Puisque le foie des animaux matures n'est pas un tissu très mitotique, on utilise souvent un paramètre non cytogénétique pour la deuxième épreuve, mais lorsque des hépatocytes en division sont présents, comme suivant une hépatectomie partielle, ou chez les jeunes rats (Hayashi et coll., 2007), il est possible de faire une analyse du micronoyau dans le foie et de détecter les composés génotoxiques connus.

13. Pour les véhicules courants comme la méthylcellulose aqueuse, cela serait normalement approprié, mais pour les véhicules comme le Tween 80, le volume pouvant être administré pourrait être aussi bas que 30 fois en dessous de ce qui est donné aux doses aiguës.
14. Il convient d'être prudent si le concept de l'étude toxicologique comprend un échantillonnage de sang supplémentaire, p. ex., pour mesurer l'exposition. Ce saignement pourrait perturber les résultats de l'analyse des micronoyaux puisque l'érythroïèse stimulée par le saignement pourrait entraîner des augmentations des érythrocytes micronucléés.
15. Les augmentations des micronoyaux peuvent se dérouler sans administration d'un agent génotoxique en raison d'une perturbation de l'érythroïèse (comme l'anémie régénératrice; l'hématopoïèse extramédullaire), le stress et l'hypo/hyperthermie (examiné par Tweats et coll., 2007, I). Dans le sang, les changements dans la fonction de la rate qui touchent l'élimination des cellules micronucléées dans le sang pourraient provoquer de légères augmentations dans le nombre de globules rouges micronucléés en circulation.
16. Témoins positifs pour les études de génotoxicité de courte durée ou à doses multiples : pour les épreuves du micronoyau (et les autres épreuves cytogénétiques), l'objectif du témoin positif est de vérifier que les personnes qui mesurent les lames peuvent détecter de manière fiable les augmentations des micronoyaux. On peut y parvenir en utilisant des échantillons d'études périodiques (tous les deux ou trois mois) sur de petits groupes d'animaux (un sexe) que l'on soumet à un traitement aigu à l'aide d'un témoin positif. Pour les mesures manuelles, ces lames peuvent être incluses dans des lames codées mesurées provenant de chaque étude. Les lames témoins positifs ne doivent pas être apparentes aux lecteurs selon leurs propriétés de coloration ou la fréquence des micronoyaux. Pour les mesures automatisées, des échantillons de contrôle de la qualité adéquats doivent être utilisés dans chaque épreuve.

Pour les autres épreuves de génotoxicité in vivo, l'objectif des témoins positifs est de démontrer une mise en évidence fiable d'une augmentation des cassures d'ADN/de la mutagénicité en utilisant l'épreuve chez l'espèce et le tissu choisi, de même que selon la

méthode voulue. Après qu'un laboratoire ait fait la preuve qu'il peut détecter de façon constante les composés de contrôle positifs dans plusieurs expériences distinctes, le fait d'effectuer des expériences de contrôle positif de façon périodique est généralement suffisant tant que les conditions expérimentales restent les mêmes. Toutefois, à l'heure actuelle on considère qu'il convient de faire des témoins positifs en parallèle pour ce qui est du test des comètes.

17. Déterminer si l'induction du micronoyau est liée principalement à la perte chromosomique ou aux bris chromosomiques pourrait comprendre de colorer les micronoyaux *in vitro* ou *in vivo* afin de déterminer si des centromères sont présents, p. ex., en utilisant l'hybridation *in situ* en fluorescence pour sonder les séquences d'ADN dans la région centromérique, ou un anticorps marqué aux protéines cinétochores. Si la plupart des micronoyaux ayant apparus sont positifs quant aux centromères, cela suggère une perte chromosomique. (Remarquez que même les puissants poisons des tubules comme la colchicine et la vinblastine ne produisent pas de micronoyaux 100 % positifs aux cinétochores, mais plutôt 70 à 80 % en général, et qu'ils sont principalement acceptés en tant qu'aneugènes pour évaluer le risque.) Une autre approche est d'effectuer une épreuve *in vitro* ou *in vivo* pour déceler les aberrations structurelles en métaphase; si le résultat est négatif, cela voudrait dire que l'induction du micronoyau est liée à la perte chromosomique.
18. Le mélange S9 induit standard possède une plus grande capacité d'activation que le S9 humain, et manque la capacité de détoxification de phase deux à moins que des cofacteurs particuliers soient fournis. Aussi, une activation non spécifique peut apparaître *in vitro* avec des concentrations élevées de substrats d'épreuve (consulter Kirkland et coll., 2007). Il peut être utile de faire un test de la génotoxicité à l'aide du S9 humain ou d'autres systèmes d'activation propres aux humains. L'analyse du profil des métabolites lors des incubations du test de génotoxicité aux fins de comparaison aux profils des métabolites connus dans les espèces précliniques (dans des microsomes ou des hépatocytes non induits ou *in vivo*) ou dans des préparations tirées d'humains peut aussi aider à établir la pertinence des résultats de test (Ku et coll., 2007) et les études de suivi mettront habituellement l'accent sur les épreuves *in vivo* dans le foie. Un composé qui donne des résultats positifs *in vitro* avec le S9 pourrait ne pas induire de génotoxicité *in vivo* parce que le métabolite n'est pas formé, est formé en très faible quantité ou est métaboliquement détoxifié ou rapidement excrété, ce qui indique une absence de risque *in vivo*.

7. GLOSSAIRE

Adduit d'ADN : Résultat d'une liaison covalente entre des produits chimiques et l'ADN.

Aneuploïdie : Écart numérique du nombre modal de chromosomes dans une cellule ou dans un organisme.

Cassure d'ADN : Rupture d'un ou de deux brins d'ADN.

Centromère/cinétocore : Structures situées dans les chromosomes jouant un rôle crucial dans l'association des chromatides sœurs et à la liaison des fibres du fuseau qui déplacent les chromosomes sœur aux pôles et assurent l'inclusion dans les noyaux filles.

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.

Changement génétique : Phénomène génétique précis faisant l'objet d'une étude particulière (p. ex., mutation génique, aberration chromosomique, réparation d'ADN, aduit d'ADN, cassure d'ADN, etc.).

Clastogène : Agent provoquant des changements structurels des chromosomes habituellement observables par microscopie optique.

Confluence de la culture : Quantification de la densité des cellules dans une culture par inspection visuelle.

CTR (croissance totale relative) : Cette mesure de la cytotoxicité utilise la croissance relative en suspension (en fonction de la perte et de la croissance cellulaire depuis le début du traitement jusqu'au second jour du post-traitement) et la multiplie par l'efficacité relative de la mise en culture au moment du clonage pour faire la quantification des mutations.

Doublement de la population ou croissance des cultures : On peut les calculer de différentes façons; voici un exemple de formule appropriée : Doublement de la population (DP) = \log du rapport du compte final (N) au compte de départ (de base) (X_0), divisé par le \log de 2. C'est-à-dire : $DP = [\log(N \cdot X_0)] \log 2$.

Efficacité de clonage : Mesure de l'aptitude des cellules uniques à former des clones. Habituellement déterminée après l'ensemencement d'un faible nombre de cellules dans un milieu propice.

Épreuve d'électrophorèse à gel sur cellule unique : Test des comètes. Consulter l'épreuve de cassure d'ADN.

Épreuve d'éluion alcaline : Consulter l'épreuve de cassure d'ADN.

Épreuve de cassure d'ADN : Traitement à l'alcaline qui convertit certains types de lésions de l'ADN en cassures pouvant être détectées par la technique d'éluion alcaline, ce qui mesure le taux de migration à travers un filtre, ou par la technique d'électrophorèse à gel sur cellule unique ou l'épreuve de Comet (où les cellules enveloppées dans une mince couche de gel sur une lamelle sont soumises à un courant électrique, ce qui entraîne la migration de plus petits morceaux d'ADN hors du noyau pour former une sorte de « queue de comète »). L'étendue de la migration d'ADN est mesurée visuellement au microscope à l'aide de cellules colorées.

Érythrocyte polychromatique : Érythrocyte immature parvenu à un stade intermédiaire de son développement, qui contient encore des ribosomes et qui, de ce fait, se distingue des érythrocytes matures normaux (dépourvus de ribosomes) à l'aide de colorants sélectifs pour l'ARN.

Évaluation cytogénétique : Analyse de la structure chromosomique pendant la mitose ou la méiose à l'aide de microscopie optique ou d'analyse du micronoyau.

Génotoxicité : Terme général désignant tout changement délétère apporté au matériel génétique, sans égard aux mécanismes qui peuvent en être responsables.

Index mitotique : Pourcentage des cellules parvenues à diverses étapes de la mitose par rapport au nombre de cellules qui ne sont pas parvenues à cette étape (en interphase) dans une préparation (lame).

Micronoyau : Particule d'une cellule qui contient de l'ADN nucléaire; il peut contenir un ou plusieurs chromosomes entiers ou une ou plusieurs portions centriques ou acentriques d'un ou de plusieurs chromosomes.

Mutation de changement de phase : Mutation (changement du code génétique) correspondant à l'addition ou à la perte d'une base ou de deux bases adjacentes dans la séquence de nucléotides d'un gène. Cette mutation correspond à un changement important au niveau de la chaîne polypeptidique.

Mutation génique : Changement permanent observable à l'intérieur d'un gène unique ou perturbation dans la séquence du code génétique. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, d'additions ou de soustractions de nucléotides.

Mutations ponctuelles : Changements du code génétique habituellement limités à une seule paire de base de la molécule d'ADN.

Plasmide : Élément génétique supplémentaire du génome bactérien normal. Un plasmide peut être inséré dans le chromosome hôte ou former un élément extrachromosomique.

Polyplœdie : Écart numérique du nombre modal du nombre de chromosomes dans une cellule, dont le nombre haploïde correspond à des multiples entiers. L'endoréduplication est une forme morphologique de polyplœdie dans laquelle les paires de chromosomes sont associées à la métaphase en tant que diplochromosomes.

Prolifération cellulaire : Aptitude des cellules à se diviser pour former des cellules filles.

Recombinaison : Processus au cours duquel l'ADN est coupé puis lié à nouveau, de façon équilibrée ou non.

Réparation de l'ADN : Reconstitution d'une séquence originale d'ADN après avoir été endommagée.

Substitution des bases : Remplacement d'une ou de plusieurs bases par d'autres bases dans la séquence des nucléotides. Cette substitution peut conduire à la production d'une protéine modifiée.

Survie (dans le contexte des essais de mutagénicité) : Proportion des cellules vivantes subsistant parmi un ensemble de cellules mortes; habituellement déterminée par la coloration ou par des méthodes de numération des colonies après une certaine période de traitement.

Synthèse d'ADN non programmée (UDS) : Synthèse d'ADN qui survient à une étape quelconque du cycle cellulaire autre que la phase S, en réaction à l'endommagement de la molécule d'ADN. Phénomène habituellement lié à la réparation de l'ADN par excision.

Test des comètes : Consulter l'épreuve de cassure d'ADN.

Transgène : Gène exogène ou étranger inséré dans le génome de la cellule hôte somatique ou de germinale.

8. RÉFÉRENCES

Ashby, J., et D. Paton. The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures, *Mutat Res*, vol. 286, 1994, p. 3-74.

Corvi, R., S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler et coll. (2008). ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT), *Mutagenesis*, vol. 23, 2008, p. 271-283.

Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, et coll. . Report from the working group on bacterial mutation assays: international workshop on standardisation of genotoxicity test procedures, *Mutat Res*, vol. 312, 1994, p. 217-233.

Goodman et Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman J. G., L. E. Limbird et A. G. Gilman, editors, 10^e ed. New York, McGraw-Hill Professional, 2001.

Greenwood, S. K., R. B. Hill, J. T. Sun, M. J. Armstrong, T. E. Johnson, J. P. Gara et coll. Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environ Mol Mutagen*, vol. 43, 2004, p. 36-44.

Hamada, S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya et coll. . Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: rapport sommaire de la 13^e étude conjointe du groupe d'étude en collaboration du test du micronoyau (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Environ Mol Mutagen*, vol. 37, 2001, p. 93-110.

Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay et coll. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 18, 2003, p. 45-51.

Hayashi, M., J. T. MacGregor, D. G. Gatehouse, I. Adler, D. H. Blakey, S. D. Dertinger et coll. . *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environ Mol Mutagen*, vol. 35, 2000, p. 234-252.

Hayashi, M., J. T. MacGregor, D. G. Gatehouse, D. H. Blakey, S. D. Dertinger, L. Abramsson-Zetterberget coll. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 10-30.

Heddle, J. A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G. R. Douglas et coll. *In vivo* transgenic mutation assays, *Environ Mol Mutagen*, vol. 35, 2000, p. 253-259.

Hotchkiss, C. E., M. E. Bishop, S. D. Dertinger, W. Slikker, M. M. Moore, J. T. MacGregor. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*macaca mulatta*), *Toxicol Sci*, vol. 102, 2008, P. 352-358.

Kasper, P., Y. Uno, R. Mauthe, N. Asano, G. Douglas, E. Matthews et coll. Follow-up testing of rodent cancérrogènes not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 106-116.

Kenelly, J. C., R. Waters, J. Ashby, P. A. Lefevre, B. Burlinson, D. J. Benford et coll. *In vivo* rat liver UDS assay, dans *Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. Kirkland D. J, et M. Fox, éditeurs, Cambridge University Press, 1993, p. 52-77.

Kirkland, D. J, S. Pfuhler, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi et coll. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of the ECVAM workshop, *Mutat Res*, vol. 628, 2007, p. 31-55.

Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech et coll. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutat Res*, vol. 540, 2003, p. 153-163.

Kissling, G. E., S. D. Dertinger, M. Hayashi, et J. T. MacGregor. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability, *Mutat Res*, vol. 634, 2007, p. 235-240.

Ku, W. W., A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P. J. Guzzie et coll. Strategy for genotoxicity testing-metabolic considerations, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 59-77.

MacGregor, J. T., M. E. Bishop, J. P. McNamee, M. Hayashi, N. Asano, A. Wakata et coll. Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicol Sci*, vol. 94, 2006, p. 92-107.

Moore, M. M., M. Honma, J. Clements, K. Harrington-Brock, T. Awogi, G. Bolcsfoldi, et coll. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: follow-up international workshop on genotoxicity test procedures - New Orleans, Louisiana, April 2000, *Environ Mol Mutagen*, vol. 40, 2002, p. 292-299.

Moore, M. M., M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone et coll. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the international workshop on genotoxicity testing - Aberdeen, Scotland, 2003 - Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation, *Environ Mol Mutagen*, vol. 47, 2006, p. 1-5.

Müller, L., et P. Kasper. Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals, *Mutat Res*, vol. 464, 2000, p. 9-34.

Lignes directrices de l'OCDE relatives à la toxicologie génétique (1997)

Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Jr. Ishidate, D. Brusick, J. Ashby et coll. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC task group 9, *Mutat Res*, vol. 257, 1991, p. 147-204.

Storer, R. D., T. W. McKelvey, A. R. Kraynak, M. C. Elia, J. E. Barnum, L. S. Harmon, et coll. Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds, *Mutat Res*, vol. 368, 1996, p. 59-101.

Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki et coll. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat Res*, vol. 583, 2005, p. 133-145.

Thybaud, V., M. Aardema, J. Clements, K. Dearfield, S. Galloway, M. Hayashi et coll. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 41-58.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita et coll. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 78-91.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A., Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita et coll. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, *Mutat Res*, vol. 627, 2007, p. 92-105.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano et coll. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, *Environ Mol Mutagen*, vol. 32, 1998, p. 84-100.