Non classifié **ENV/JM/MONO(2004)26**

Organisation de Coopération et de Développement Economiques
Organisation for Economic Co-operation and Development **01-Dec-2004**

Français - Or. Anglais

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
REUNION CONJOINTE DU COMITE SUR LES PRODUITS CHIMIQUES ET DU GROUPE DE TRAVAIL SUR LES PRODUITS CHIMIQUES, LES PESTICIDES ET LA BIOTECHNOLOGIE

ENV/JM/MONO(2004)26
Non classifié

SERIE SUR LES PRINCIPES DE BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE ET VERIFICATION DU RESPECT DE CES PRINCIPES
Numéro 14

Document indicatif du Sous groupe de l'OCDE sur les bonnes pratiques de laboratoire:

Application des Principes de BPL aux études in vitro

Français - Or. Anglais

JT00174989

Document complet disponible sur OLIS dans son format d'origine
Complete document available on OLIS in its original format

Publications de l'OCDE sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement

Série sur les Principes de Bonnes pratiques de laboratoire et

Vérification du respect de ces Principes

No. 14

Document indicatif du Sous-groupe de l'OCDE sur les bonnes pratiques de laboratoire :

Application des Principes de BPL aux études *in vitro*

Direction de l'environnement

ORGANISATION DE CO-OPERATION ET DEVELOPPEMENT ECONOMIQUES

Paris 2004

Egalement publiés dans la série sur les Principes de Bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces Principes:

No. 1, *Les principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997*)

No. 2, *Guides revisés pour les systèmes de vérification du respect des Bonnes pratiques de laboratoire* (*1995)*

No. 3, *Directives revisées pour la conduite d'inspections de laboratoire et de vérification d'études (1995)*

No. 4, *Assurance qualité et BPL (tels que révisés en 1999)*

No. 5, *Respect des Principes de BPL par les fournisseurs d'équipements de laboratoires (tels que révisés en 1999)*

No. 6, *Application des Principes de Bonnes pratiques de laboratoire aux études sur le terrain (tels que révisés en 1999)*

No. 7, *Application des Principes de BPL aux études à court terme (tels que révisés en 1999)*

No. 8, *Rôle et responsabilités du directeur de l'étude dans les travaux sur les BPL (tels que révisés en 1999)*

No. 9, *Directives pour la préparation de rapports d'inspection en matière de BPL (1995)*

No. 10, *Application des Principes de BPL aux systèmes informatiques (1995)*

No. 11, *Le rôle et les responsabilités du donneur d'ordre lors de l'application des Principes de BPL (1998*)

No. 12, *Recommandations concernant la demande et la réalisation d'inspections et de vérifications d'études dans un autre pays (2000)*

No. 13, *Application des Principes de BPL de L'OCDE à l'organisation et la conduite des études multi-site* (2002)

© OCDE 2004

Les demandes de reproduction ou de traduction doivent être adressées à :
M. le Chef du Service des Publications, OCDE, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France.

A propos de l'OCDE

L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) est une organisation intergouvernementale au sein de laquelle des représentants de 30 pays industrialisés d'Amérique du Nord, d'Europe et de la région Asie-Pacifique ainsi que de la Commission européenne se réunissent afin de coordonner et d'harmoniser leurs politiques, d'examiner des questions d'intérêt commun et de coopérer à la résolution de problèmes internationaux. La majeure partie des travaux de l'OCDE sont menés à bien par plus de 200 comités spécialisés et sous-groupes composés de délégués des pays Membres. Des observateurs de différents pays possédant un statut spécial auprès de l'OCDE, et d'organisations internationales intéressées assistent à nombre d'ateliers et d'autres réunions de l'OCDE. Le Secrétariat de l'OCDE, qui a son siège à Paris (France), assiste les comités et les sous-groupes et se compose de directions et de divisions.

La Division sur l'hygiène et de la sécurité de l'environnement publie gratuitement ses documents en neuf séries : **Essais et évaluation; Les Principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes; Pesticides et Biocides; Inventaire gestion des risques; Harmonisation de la surveillance réglementaire en biotechnologie; Sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale; Accidents chimiques; d'Emissions et de transferts de matières polluantes; et Scénarios d'émission**. Les documents publiés dans ces séries peuvent être obtenus gratuitement sur simple demande. Pour de plus amples renseignements concernant le Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement et ses publications, le site WWW (World Wide Web) de l'OCDE (voir page suivante) est à votre disposition.

La présente publication a été préparée dans le cadre du Programme interorganisations pour la gestion rationnelle des produits chimiques (IOMC).

Le Programme interorganisations pour la gestion rationnelle des produits chimiques (IOMC) a été établi en 1995 suite aux recommandations de la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement tenue en 1992, afin de renforcer la coopération et d'accroître la coordination internationale dans le domaine de la sécurité chimique. Les Organisations Participantes sont la FAO, l'OIT, l'OCDE, le PNUE, l'ONUDI, l'UNITAR et l'OMS. La Banque Mondiale et le PNUD sont observateurs. L'objectif de l'IOMC est de promouvoir la coordination des politiques et des activités poursuivies, conjointement ou séparément, par les Organisations Participantes, afin d'atteindre une gestion rationnelle des produits chimiques pour la santé et l'environnement.

La présente publication est disponible gratuitement sous forme électronique.

Pour cette publication ou toute autre publication du Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement, veuillez consulter le site WWW de l'OCDE (www.oecd.org/ehs/).

ou contacter:

Direction de l'Environnement de l'OCDE,
Division de l'hygiène et de la sécurité de l'environnement

2, rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16
France

Fax: (33-1) 45 24 16 75

E-mail: ehscont@oecd.org

Avant-propos

A mesure que s'intensifient les efforts visant à réduire l'utilisation des animaux dans les essais de sécurité, les procédés *in vitro* sont mis en avant pour remplacer ou compléter les essais *in vivo*. Les progrès attendus dans les domaines de la toxicogénomique, de la toxicoprotéomique, de la toxicométabolomique et de diverses techniques de criblage à haut débit devraient eux aussi renforcer l'importance des méthodes *in vitro* pour les essais de sécurité au-delà de leur champ d'application traditionnel que sont les essais sur la génotoxicité. Le Sous-groupe de l'OCDE sur les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) a donc jugé utile de formuler des orientations complémentaires concernant spécifiquement l'application et l'interprétation des Principes de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE[1] dans le cadre des études *in vitro*.

Le Sous-groupe a créé un Groupe d'étude placé sous la direction de la Suisse, qui s'est réuni les 12 et 13 février 2004 à Berne. Le Groupe d'étude était composé de membres du Sous-groupe, ou d'experts des essais *in vitro* nommés par ceux-ci, représentant la Belgique, les Etats-Unis, la France, le Japon, les Pays-Bas, la Suisse et la Commission européenne.

Le projet de document indicatif élaboré par le Groupe d'étude a été examiné par le Sous-groupe en mai 2004 à sa 18ème réunion, où il a été modifié et approuvé. A leur 37ème réunion conjointe, le Comité des produits chimiques et le Groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie ont à leur tour entériné le document et recommandé sa déclassification sous l'autorité du Secrétaire général de l'OCDE.

[1] Voir No.1 de la série sur *les Principes de Bonnes pratiques de laboratoire et Vérification du respect de ces Principes*

Document indicatif du Sous-groupe de l'OCDE sur les bonnes pratiques de laboratoire : application des principes de BPL aux études *in vitro*

Contexte

Les études faisant intervenir des systèmes d'essai *in vitro* sont utilisées depuis longtemps pour obtenir des données sur la sécurité des produits chimiques pour la santé humaine et l'environnement. La législation nationale exige en général que ces études soient conduites dans le respect des règles relatives aux bonnes pratiques de laboratoires (BPL)[2]. Traditionnellement, les méthodes *in vitro* sont principalement employées dans le domaine des essais sur la génotoxicité, où l'évaluation du danger s'appuie en grande partie sur les données issues d'études fondées sur des systèmes d'essai *in vitro*. A mesure que s'intensifient les efforts visant à réduire l'utilisation des animaux dans les essais de sécurité, les procédés *in vitro* sont mis en avant pour remplacer ou compléter les essais de sécurité *in vivo*. En outre, les progrès dans les domaines de la toxicogénomique, de la toxicoprotéomique, de la toxicométabolomique et de diverses techniques de criblage à haut débit (puces à ADN, par exemple) accroîtront eux aussi l'importance des méthodes *in vitro* pour les essais de sécurité.

La nécessité de planifier, de conduire, d'enregistrer, de diffuser et d'archiver les études de sécurité conformément aux *Principes de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE* (ci-après « principes de BPL ») est la même quel que soit le type d'étude. Par conséquent, les règles et les orientations générales décrites dans les principes de BPL et dans les documents de consensus[3] qui leurs sont associés s'appliquent à toutes les études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement, y compris les études *in vitro*. En vue de faciliter l'application et l'interprétation des principes de BPL dans le cadre particulier des essais *in vitro*, il a été jugé utile de fournir des explications et des orientations supplémentaires.

Objet du présent document

L'objet du présent document est de favoriser une application et une interprétation correctes des principes de BPL dans l'organisation et la conduite des études *in vitro*, et de formuler des orientations sur la bonne application de ces principes aux études *in vitro*, à l'intention des installations d'essai (direction, assurance qualité, directeur de l'étude et personnel) et des autorités nationales chargées du contrôle de leur application.

Le présent document vise à apporter ces indications supplémentaires sur l'interprétation des principes et des orientations sur leur application aux études *in vitro* conduites à des fins réglementaires. Son plan respecte l'ordre dans lequel sont présentés les principes de BPL, de manière à faciliter sa consultation.

---

[2] Révision des principes relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire [C(97)186 (Final)].

[3] Voir la série de l'OCDE sur les Principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes.

Champ d'application

Le présent document porte spécifiquement sur l'application des principes de BPL aux études *in vitro* conduites dans le cadre des essais de sécurité non cliniques des éléments contenus dans des produits pharmaceutiques, des pesticides, des cosmétiques, des médicaments vétérinaires, des additifs pour l'alimentation humaine et animale et des produits chimiques industriels. Ces éléments soumis à des essais sont souvent des produits chimiques de synthèse, mais peuvent avoir une origine naturelle ou biologique et être des organismes vivants dans certaines circonstances. Les essais effectués sur ces éléments visent à fournir des données sur leurs propriétés et/ou leur innocuité du point de vue de la santé humaine et/ou de l'environnement.

Sauf exemption expressément prévue dans la législation nationale, les principes de bonnes pratiques de laboratoire s'appliquent à toutes les études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement requises par la réglementation à des fins d'homologation ou d'autorisation de produits pharmaceutiques, de pesticides, d'additifs pour l'alimentation humaine et animale, de cosmétiques, de médicaments vétérinaires et de produits analogues, ainsi qu'aux fins de la réglementation de produits chimiques industriels.

Terminologie

a) Etudes in vitro

Les études *in vitro* sont des études qui utilisent comme systèmes d'essai non pas des organismes multicellulaires entiers, mais des micro-organismes ou du matériel isolé à partir d'organismes entiers, ou encore des simulations de ceux-ci.

Beaucoup d'études *in vitro* peuvent être considérées, aux termes de la définition fournie dans les principes de BPL, comme des études à court terme. A ce titre, il convient de consulter et d'appliquer comme il se doit le *document de consensus de l'OCDE sur l'application des principes de BPL aux études à court terme*, de manière à permettre l'application des dispositions facilitant la tâche du directeur de l'étude et du personnel chargé du programme d'assurance qualité.

b) Elément de référence

Les lignes directrices pour les essais applicables aux études *in vitro* imposent dans de nombreux cas d'utiliser des témoins positifs, négatifs et/ou traités avec le véhicule qui ne peuvent pas servir, au sens de la définition des « éléments de référence » donnée dans les principes de BPL, à mesurer la réponse du système d'essai à l'élément d'essai, mais à contrôler le bon fonctionnement de ce système d'essai. Dans la mesure où l'objet de ces témoins positifs, négatifs et/ou traités avec le véhicule peut être jugé analogue à celui d'un élément de référence, la définition de ce dernier peut être considérée comme englobant aussi les termes « témoins positifs, négatifs et/ou traités avec le véhicule ». Toutefois, le degré de leur caractérisation par l'analyse ne correspond pas nécessairement à celui qui est prescrit dans le cas des éléments de référence.

Responsabilités

a) Direction de l'installation d'essai

La plupart des responsabilités de la direction d'une installation d'essai revêtent un caractère général et s'appliquent de la même manière aux études *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, la direction doit veiller à ce que l'installation d'essai dispose de personnel qualifié, ainsi que des installations et des équipements nécessaires pour que l'étude se déroule en temps voulu et de façon adéquate. Cependant, elle doit être consciente du fait que les essais *in vitro* peuvent avoir une incidence sur l'exécution de certaines de ses responsabilités. Par exemple, elle doit veiller à ce que les membres du personnel comprennent précisément les fonctions qu'ils sont censés assurer. En ce qui concerne les études *in vitro*, cela peut supposer de faire en sorte que les procédures d'asepsie et la manipulation des matériaux biologiquement dangereux font l'objet de formations spécifiques. Les essais *in vitro* peuvent aussi nécessiter de disposer de secteurs spécialisés et de mettre en œuvre des procédures évitant la contamination des systèmes d'essai. La direction est par ailleurs tenue de veiller à ce que les fournitures reçues par l'installation d'essai remplissent les conditions nécessaires à leur utilisation dans une étude. Certaines études *in vitro* peuvent nécessiter d'utiliser des matériels ou des kits d'analyse couverts par la propriété industrielle. Le *document de consensus de l'OCDE sur le respect des principes de BPL par les fournisseurs d'équipements de laboratoire* stipule que, pour qu'une étude soit conforme aux BPL, les matériels utilisés doivent être produits et validés dans le cadre d'un système qualité adéquat, en vertu de quoi c'est au premier chef à leur fabricant ou à leur fournisseur qu'il incombe de s'assurer qu'ils sont adaptés, mais il appartient à la direction de l'installation d'essai de confirmer que ces conditions sont remplies de manière satisfaisante moyennant une évaluation des pratiques, procédures et principes appliqués par les fournisseurs.

b) Directeur de l'étude

Les responsabilités générales du directeur de l'étude ne sont pas liées à la nature de l'étude et celles qui sont énoncées dans les principes s'appliquent y compris aux études *in vitro*. Le directeur de l'étude reste seul en charge du contrôle de l'étude et assume la responsabilité de sa conduite générale et de l'établissement du rapport.

En ce qui concerne les études *in vitro*, le directeur de l'étude doit apporter un soin particulier aux pièces justifiant et caractérisant le système d'essai retenu. Veuillez vous référer à la section ci-dessous sur les Systèmes d'essai, concernant la documentation demandée pour justifier et caractériser le système d'essai. Cette activité peut être plus difficile dans le cas des études *in vitro*. S'agissant des études *in vivo*, elles sont assez simples. Par exemple, la justification de l'utilisation d'une espèce particulière peut être apportée au moyen de pièces sur les caractéristiques qui font de cette espèce un modèle adapté à l'évaluation des effets d'intérêt. Ainsi, la caractérisation d'un animal particulier peut simplement reposer sur des informations sur l'espèce, la race, la variété, l'origine, le nombre d'individus, la gamme de poids, le sexe et l'âge.

Ces activités peuvent être plus difficiles à réaliser dans le cas des études *in vitro*.

Ainsi, la justification du système d'essai peut contraindre le directeur de l'étude à faire la preuve que la méthode d'essai a été validée ou qu'elle est similaire à une méthode d'essai de référence validée des points de vue structurel, fonctionnel et/ou mécanique. Avant d'employer une nouvelle méthode d'essai similaire à une méthode de référence validée des points de vue structurel, fonctionnel et/ou mécanique, il est donc tenu de fournir des pièces attestant que cette nouvelle méthode donne des résultats comparables lorsqu'elle est évaluée avec des éléments de référence appropriés.

Par ailleurs, les caractéristiques des systèmes *in vitro* peuvent être difficiles à établir. Bien que le directeur de l'étude puisse être en mesure, avec le concours du fournisseur, de documenter certaines des caractéristiques du système (lignée cellulaire, âge/passage, origine, par exemple), il doit aussi caractériser

ce système en établissant qu'il donne les résultats voulus lorsqu'il est évalué au moyen d'éléments de référence, y compris au moyen de témoins positifs, négatifs, non traités et/ou traités avec le véhicule, si nécessaire. L'utilisation de matériels ou de kits d'analyse couverts par la propriété industrielle dans la conduite d'études *in vitro* peut être considérée comme un cas particulier. En effet, si les performances de ces matériels et kits d'analyse doivent être garanties par leur fournisseur, leur producteur ou le titulaire du brevet, et s'il incombe à la direction de l'installation d'essai de veiller à ce que le fournisseur répond aux critères de qualité indiqués plus haut, par exemple en vérifiant les pratiques, procédures et principes qu'il applique, c'est au directeur de l'étude qu'il appartient de veiller à ce que les performances de ces matériels et kits répondent bien aux exigences de l'étude et à ce que les kits d'analyse aient été validés comme il se doit et conviennent à l'usage qui va en être fait. Dans la mesure où la qualité et la fiabilité des résultats de l'étude sont directement influencées par la qualité et le fonctionnement de ces matériels et kits d'analyse, il est primordial que le directeur de l'étude procède à un examen approfondi et à une évaluation critique attestant que la documentation du contrôle qualité délivrée par le fournisseur est complète et acceptable. Au minimum, le directeur de l'étude doit être à même de juger de la validité du système qualité utilisé par le fabricant et disposer de toute la documentation nécessaire pour évaluer l'applicabilité du système d'essai, par exemple de résultats d'études de performances.

c) Personnel

Le personnel doit observer scrupuleusement, lorsqu'il y a lieu, les conditions d'asepsie prescrites et respecter les procédures correspondantes dans la conduite des études *in vitro*, pour éviter la contamination des systèmes d'essai par des agents pathogènes. De même, il doit appliquer des pratiques adéquates (voir « Autres sources d'information », référence 1) pour éviter les contaminations croisées entre systèmes d'essai et garantir l'intégrité de l'étude. Le personnel de l'étude doit avoir connaissance des règles à respecter pour isoler les systèmes d'essai et études faisant intervenir des matériaux biologiquement dangereux et y adhérer strictement. De même, des précautions appropriées doivent être prises pour réduire au minimum les risques liés à l'utilisation de produits chimiques dangereux durant les études *in vitro*.

Assurance qualité

De manière générale, les activités d'assurance qualité (AQ) ne sont pas très différentes dans les études *in vitro* et dans les études *in vivo*. Dans certains cas, les études *in vitro* peuvent répondre aux critères requis pour être conduites dans les conditions des études à court terme ; dans ces cas, le *document de consensus de l'OCDE sur l'application des principes de BPL aux études à court terme* est applicable. En conséquence, ces études peuvent donner lieu à des inspections, lorsqu'il y a lieu et sous réserve que les réglementations nationales le permettent, conduites par le personnel chargé de l'assurance qualité dans le cadre d'un programme d'inspections portant sur les procédés. Dans la mesure où les principes de BPL exigent que les inspections portent en particulier sur les phases critiques, il importe, en ce qui concerne les études *in vitro*, que le personnel chargé de l'assurance qualité sache repérer avec précision les phases en question (et les aspects critiques) dans ces études. A cet effet, des orientations à l'intention du personnel chargé de l'assurance qualité doivent être formulées en coopération avec le directeur de l'étude, le responsable principal des essais et le personnel de l'étude, dans les domaines pertinents. Dans la mesure où le programme d'assurance qualité doit, chaque fois que cela est indiqué, couvrir explicitement des aspects spécifiques des essais *in vitro*, la formation dispensée au personnel chargé de l'assurance qualité doit elle aussi porter explicitement sur l'aptitude à repérer les problèmes potentiels dans des domaines particuliers des essais de ce type.

Les domaines particuliers sur lesquels doivent porter les inspections peuvent comprendre, sans y être limités, les procédures et mesures concernant :

- le contrôle des lots de composants de milieu de culture cellulaire et tissulaire essentiels au fonctionnement du système d'essai (sérum de veau fœtal, par exemple) et d'autres matériaux eu égard à leur influence sur le fonctionnement du système d'essai ;
- l'évaluation et la garantie du statut fonctionnel et/ou morphologique (et de l'intégrité) des cellules, des tissus et d'autres matériaux indicateurs ;
- la détection de contaminations potentielles par des cellules étrangères, des mycoplasmes et d'autres agents pathogènes ou adventices, si nécessaire ;
- le nettoyage et la décontamination des installations et des équipements, et la réduction au minimum des sources de contamination des systèmes et éléments d'essai ;
- les activités visant à garantir que les équipements sont utilisés et entretenus correctement ;
- les activités visant à garantir une cryopréservation et une reconstitution satisfaisante des cellules et des tissus ;
- les activités visant à garantir des conditions satisfaisantes pour le retrait des matériels des congélateurs ;
- les activités visant à garantir la stérilité des matériels et fournitures utilisés dans la culture des cellules et des tissus ;
- le maintien d'une séparation adéquate entre différentes études et différents systèmes d'essai.

Installations

a) Généralités

Les principes de BPL stipulent que les installations d'essai doivent répondre aux exigences des études qui y sont conduites et que leur agencement doit permettre une séparation suffisante des différentes activités, de manière à assurer une exécution correcte, et sans perturbation, de chaque étude. Dans la mesure où les études *in vitro* ne mobilisent en général que peu d'espace et ne nécessitent habituellement pas d'installations qui leur soient exclusivement réservées et excluent la réalisation d'autres études, des mesures doivent être prises pour garantir une séparation appropriée entre les études *in vitro* conduites simultanément dans le même environnement physique.

b) Installations relatives au système d'essai

Les principes de BPL stipulent que l'installation d'essai doit comporter un nombre suffisant de salles ou de locaux pour assurer la séparation des systèmes d'essai, et que ces locaux doivent permettre de limiter au minimum les risques de contamination des systèmes d'essai. Le terme « locaux », cependant, n'est pas défini avec précision et son interprétation peut donc varier selon les situations où s'inscrivent les essais *in vitro*. Ce qu'il convient de retenir, ici, c'est que l'intégrité de chaque système d'essai et de chaque étude ne doit pas être compromise par l'éventualité d'une contamination, d'une contamination croisée ou d'un mélange.

Ainsi, il est possible de cultiver dans un même incubateur les cellules et les tissus correspondant à différentes études, sous réserve d'une séparation suffisante (identifiants, étiquetage ou emplacements séparés, par exemple) et à condition qu'aucun des éléments d'essai ne soit suffisamment volatile pour contaminer les autres études mobilisant le même incubateur.

La séparation des phases critiques d'une étude est parfois possible dans l'espace, mais elle peut aussi l'être dans le temps. La manipulation des cultures cellulaires et tissulaires, par exemple les repiquages ou l'ajout d'éléments d'essai, etc., est généralement réalisée dans des hottes à flux laminaire vertical pour assurer la stérilité et pour protéger le système d'essai ainsi que le personnel de l'étude et l'environnement. Dans ces circonstances, pour assurer une séparation adéquate et éviter les contaminations croisées entre différentes études, il faut manipuler un par un les systèmes d'essai utilisés dans chacune des études, et nettoyer et décontaminer/stériliser les surfaces de travail des hottes et des équipements de laboratoire entre les diverses activités, chaque fois que cela est nécessaire.

Il importe également de disposer de salles ou locaux spécifiques dotés d'équipements spéciaux pour le stockage à long terme des systèmes d'essai. Ces équipements, y compris les conteneurs de stockage, doivent présenter les caractéristiques requises pour garantir à longue échéance l'intégrité des systèmes d'essai.

c) Installations de manutention des éléments d'essai et de référence

Si les règles de manutention des éléments d'essai et de référence indiquées dans les principes de BPL s'appliquent de la même manière aux essais *in vitro* pour ce qui est de la prévention des contaminations croisées par ces éléments, un autre aspect mérite d'être pris en considération : la stérilité étant une dimension importante dans les études *in vitro*, il convient de veiller à ce que les salles et les locaux utilisés pour préparer les éléments d'essai et de référence et les mélanger avec les véhicules soient équipés de manière à ce qu'il soit possible de travailler en conditions d'asepsie, et donc de protéger le système d'essai et l'étude en limitant au minimum la probabilité de leur contamination par la préparation des éléments d'essai et de référence.

Appareils, matériaux et réactifs

Les règles ordinaires et communément observées applicables aux appareils employés dans les environnements conformes aux BPL valent également pour les appareils utilisés dans les études *in vitro*, mais certains points précis revêtent en l'occurrence une importance particulière. Par exemple, il peut être important, pour l'intégrité et la fiabilité de certaines études *in vitro*, de veiller à ce que certains équipements tels que les microbalances, les micropipettes, les hottes à flux laminaire ou les incubateurs soient maintenus en permanence dans un état satisfaisant, et contrôlés et étalonnés le cas échéant. En ce qui concerne les équipements spécifiques, les paramètres critiques nécessitant un contrôle en continu ou la détermination de valeurs limites et l'installation d'alarmes doivent être mis en évidence.

Les règles édictées dans les principes de BPL au sujet de l'étiquetage et des dates d'expiration des réactifs s'appliquent de la même manière dans le cadre des études *in vitro*.

Systèmes d'essai

Les systèmes d'essai *in vitro* sont principalement des systèmes biologiques, même si certaines des techniques mises au point dernièrement pour remplacer les essais classiques *in vivo* (puces à ADN en toxicogénomique, par exemple) peuvent aussi revêtir certaines caractéristiques des systèmes physiques et chimiques, et si d'autres encore, par exemple la toxicométabolomique, s'appuient essentiellement sur une

méthodologie analytique. Les kits d'analyse, y compris les kits couverts par la propriété industrielle, doivent aussi être considérés comme des systèmes d'essai.

a) Conditions applicables aux systèmes d'essai

Comme pour tout autre système d'essai biologique, des conditions adéquates doivent être définies, maintenues et contrôlées pour assurer la qualité et l'intégrité du système d'essai, pendant le stockage et dans le cadre de l'étude elle-même. Cela comprend la définition, le maintien et le contrôle, attestés par des documents, de la viabilité et de la réactivité du système d'essai, y compris l'enregistrement du nombre de passages en culture et les temps de doublement des populations de cellules. Il faut aussi tenir un registre des conditions environnementales (par exemple, niveau d'azote liquide dans un système de cryoconservation à l'azote liquide, température, humidité et concentration de CO_2 dans les incubateur, etc.) et des manipulations du système d'essai nécessaires au maintien de sa qualité et de son intégrité (traitement aux antibiotiques ou antifongiques, subcultures, cultures sélectives visant à réduire la fréquence des événements spontanés). Dans la mesure où le maintien de conditions environnementales adaptées, pendant le stockage des systèmes d'essai, peut avoir une plus grande influence sur la qualité des données que dans les autres systèmes biologiques ces registres peuvent être particulièrement importants pour maintenir la qualité et la fiabilité des données.

b) Systèmes d'essai nouveaux

La documentation obtenue du fournisseur de systèmes d'essai *in vitro* (par exemple, origine, âge/nombre de passages, temps de doublement du nombre de cellules et autres caractéristiques utiles à l'identification du système) doit être examinée et conservée avec les archives de l'étude. Des critères prédéfinis doivent être employés pour établir que le système est viable, adapté (état fonctionnel et/ou morphologique des cellules et des tissus, vérification de l'absence de contaminants microbiologiques ou viraux connus ou suspectés) et réactif. Les résultats de ces évaluations doivent être consignés et conservés avec les archives de l'étude. Si une évaluation de ce type n'est pas possible, par exemple dans le cas des cultures primaires ou des « organes reconstitués », il doit exister entre le fournisseur et l'utilisateur un mécanisme permettant d'établir que le système d'essai est adapté et de l'indiquer dans un document. En ce qui concerne la réactivité d'un système d'essai donné, le contrôle et l'enregistrement des performances comparées à celles de témoins positifs et négatifs peuvent constituer une preuve suffisante. Tout problème posé par le système d'essai susceptible de rejaillir sur la qualité, la validité et la fiabilité de l'étude doit être consigné et commenté dans le rapport final. Les problèmes soulevés par les systèmes d'essai provenant d'un fournisseur doivent être rapportés à ce dernier et une solution doit être recherchée.

c) Registres relatifs aux systèmes d'essai

Les principes de BPL stipulent qu'il faut tenir des registres mentionnant l'origine, la date d'arrivée et l'état à l'arrivée des systèmes d'essai. En ce qui concerne les cellules et les tissus, ces registres doivent indiquer non seulement leur source immédiate (par exemple le fournisseur), mais aussi leur origine initiale (par exemple, les cellules ou tissus primaires accompagnés des caractéristiques des donneurs, les lignées cellulaires établies issues de sources reconnues, etc.). Les autres informations à conserver sont, au minimum, la méthode au moyen de laquelle les cellules ou tissus ont été obtenus initialement (à partir d'explants, de biopsies de tissus normaux ou cancéreux, de transferts de gènes par transfection de plasmide ou transduction par l'intermédiaire d'un virus, etc.), la chronologie des changements de dépositaires, le nombre de passages des lignées cellulaires, les conditions de culture et intervalles entre subcultures, les conditions de congélation/décongélation, etc. En ce qui concerne les systèmes d'essai transgéniques, il est en outre nécessaire d'établir la nature du transgène et de contrôler le maintien de l'expression au moyen d'éléments de contrôle appropriés.

Une attention particulière doit être accordée à l'étiquetage des systèmes d'essai pendant leur stockage et leur utilisation, ce qui suppose entre autres de prendre des mesures pour assurer la durabilité de cet étiquetage. Notamment, lorsque la taille des récipients et les conditions de stockage (par exemple, cryotubes plongés dans l'azote liquide, systèmes d'essai multiples conservés dans un récipient unique) peuvent constituer des facteurs critiques pour l'étiquetage, des mesures doivent être prises pour garantir une identification correcte des systèmes d'essai à tout moment.

Les règles édictées dans les principes de BPL de l'OCDE au sujet de l'étiquetage et des dates d'expiration des éléments d'essai et des réactifs s'appliquent de la même manière aux kits d'analyse utilisés dans les systèmes d'essai *in vitro*. Ces kits, qu'ils soient employés en tant que systèmes d'essai ou d'une autre manière, par exemple à des fins d'analyse, doivent avoir une date d'expiration. La prorogation de la date d'expiration doit impérativement être précédée d'une évaluation (ou d'une analyse) étayée par des documents. S'agissant des kits d'analyse servant de systèmes d'essai, cette évaluation étayée par des documents peut par exemple reposer sur le relevé des réactions obtenues antérieurement avec le même lot à des témoins positifs et négatifs et/ou à un véhicule, et sur la preuve que, même après la date d'expiration, la réaction ne dévie pas des valeurs de référence antérieures. La décision du directeur de l'étude quant à la prorogation de la date d'expiration, étayée par des documents, doit être accompagnée d'éléments attestant que cette évaluation a été réalisée.

Pour éviter les éventuelles confusions, la nomenclature des systèmes d'essai doit être clairement définie et leurs étiquettes, ainsi que tous les relevés établis à partir de chaque étude, doivent mentionner la désignation du système d'essai officiellement acceptée.

Éléments d'essai et de référence (y compris les témoins négatifs et positifs)

De manière générale, il n'existe pas de règle spécifique concernant la réception, la manutention, l'échantillonnage, le stockage et la caractérisation des éléments d'essai et de référence utilisés dans les études faisant appel à des systèmes d'essai *in vitro*, outre ceux qui sont indiqués dans les principes de BPL. Il peut néanmoins être nécessaire de faire respecter des conditions d'asepsie dans leur manutention, pour éviter la contamination microbiologique des systèmes d'essai.

En ce qui concerne les témoins négatifs et positifs et les témoins traités avec le véhicule, il n'est pas toujours nécessaire de déterminer la concentration et l'homogénéité, car il peut être suffisant de fournir des données sur la réaction correcte, attendue, du système d'essai à ces éléments.

La date d'expiration de ces éléments de référence peut elle aussi être prorogée après évaluation ou analyse étayée par des documents. Cette évaluation peut reposer sur des données, attestées par des documents, indiquant que la réaction des systèmes d'essai concernés à ces témoins positifs et négatifs et/ou au véhicule ne dévie pas des valeurs de référence antérieures enregistrées par l'installation d'essai, lesquelles doivent par ailleurs être comparables aux valeurs de référence publiées.

Modes opératoires normalisés

Outre les exemples cités dans les principes de BPL (voir les sections 7.4.1 à 7.4.5), certaines activités et certains procédés propres aux essais *in vitro* doivent être décrits dans les modes opératoires normalisés. Ces derniers devraient notamment englober, sans s'y limiter, les activités données ci-après à titre d'exemple et conduites par les installations d'essai dans le cadre des essais *in vitro*.

a) Installations

Surveillance de l'environnement axée sur les agents pathogènes présents dans l'atmosphère et sur les surfaces, nettoyage et désinfection, mesures à prendre en cas d'infection ou de contamination dans l'installation ou le local d'essai.

b) Appareils

Utilisation, entretien, surveillance du fonctionnement, nettoyage et décontamination des équipements et instruments de culture cellulaire et tissulaire, tels que hottes à flux laminaire et incubateurs ; surveillance des niveaux d'azote liquide dans les cuves de stockage ; étalonnage et surveillance de la température, de l'humidité et des niveaux de CO_2 dans les incubateurs.

c) Matériaux, réactifs et solutions

Evaluation de l'indication, prorogation des dates d'expiration, évaluation et maintien de la stérilité, recherche des contaminants pathogènes communs ; description des procédures applicables au choix et à l'utilisation des véhicules ; procédures de vérification de la compatibilité entre les véhicules et le système d'essai.

d) Systèmes d'essai

Conditions de stockage et procédures de congélation et de décongélation des cellules et des tissus, recherche des agents pathogènes communs ; recherche de contamination par inspections visuelles ; procédures de vérification (par exemple, utilisation des critères d'acceptation) des propriétés et de la réactivité à l'arrivée et pendant l'utilisation, applicables soit immédiatement après l'arrivée soit après stockage ; évaluation morphologique, contrôle de la stabilité du phénotype ou du caryotype, contrôle de la stabilité du transgène ; mode de démarrage de la culture, conditions de culture et intervalles entre les subcultures ; manutention des matériels et systèmes d'essai biologiquement dangereux, procédures d'élimination des systèmes d'essai.

e) Réalisation de l'étude

Techniques d'aseptisation, critères d'acceptation de la validité de l'étude, critères relatifs à la répétition des essais.

f) Assurance qualité

Définition des phases critiques, fréquence des inspections.

Réalisation de l'étude et établissement du rapport sur les résultats de l'étude

Les règles de BPL concernant la réalisation des études *in vitro* sont identiques à celles qui s'appliquent aux études de sécurité plus classiques. Dans de nombreux cas, le *document de consensus de l'OCDE sur l'application des principes de BPL aux études à court terme* peut être consulté parallèlement aux règles en question, de manière à ce que les études *in vitro* soient conduites dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire.

Plusieurs aspects propres aux essais *in vitro* doivent être abordés dans le plan de l'étude et dans le rapport final. Toutefois, il s'agit essentiellement d'aspects de nature scientifique et technique, par exemple de la nécessité (scientifique) d'effectuer tous les contrôles internes (témoins positifs et négatifs ou témoins traités ou non avec le véhicule) destinés à vérifier les biais et à évaluer le fonctionnement du système d'essai en même temps avec l'élément d'essai dans toutes les études *in vitro*. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais et d'autres documents de référence fournissent des orientations plus précises à propos des sujets qu'il convient de traiter dans le plan de l'étude et dans le rapport final.

Stockage et conservation des archives et des matériaux

Les règles générales énoncées dans les principes de BPL s'appliquent à toutes les études *in vitro*. En outre, il convient d'envisager de conserver des échantillons des systèmes d'essai pouvant être préservés sur une longue durée, notamment dans le cas des systèmes d'essai disponibles en quantités limitées (sous-clones spéciaux de lignées cellulaires, cellules transgéniques, etc.), pour permettre de confirmer l'identité des systèmes d'essai et/ou de reconstruire l'étude.

La conservation d'échantillons d'éléments d'essai doit également être envisagée dans le cas des études *in vitro* qui peuvent être classées dans la catégorie des études à court terme, notamment dans les cas où les études *in vitro* constituent l'essentiel des études de sécurité.

Il faut aussi conserver les archives des résultats obtenus antérieurement avec les témoins positifs et négatifs et les témoins traités ou non avec le véhicule utilisés pour établir la fourchette de réaction acceptable du système d'essai.

Glossaire

Les définitions ci-dessous s'appliquent dans le présent document :

Cellule primaire : cellule venant d'être isolée d'une source animale ou végétale. Ces cellules ont la possibilité de se dédifférencier rapidement en culture et ont souvent une durée de vie limitée. Les cultures primaires isolées à partir d'animaux ou d'humains peuvent constituer des populations hétérogènes du point de vue, par exemple, des types de cellules et des états de différenciation, en fonction des techniques de purification employées. Chaque isolat est unique et impossible à reproduire exactement. Les cultures de cellules primaires nécessitent en général un milieu nutritif complexe, complété par un sérum et d'autres composants. Par conséquent, les systèmes de culture de cellules primaires sont extrêmement difficiles à standardiser.

Cellule transgénique : cellule dans laquelle sont insérés un ou plusieurs gènes étrangers qui, ensuite, expriment des caractéristiques ou des fonctions qui, normalement, ne sont pas présentes dans la cellule parentale ou qui ne sont présentes qu'à de faibles niveaux d'expression.

Conditions d'asepsie : conditions assurées dans l'environnement de travail en vertu desquelles la probabilité de contamination microbiologique et/ou virale est limitée au minimum.

Contamination croisée : contamination d'un élément d'essai par un autre ou d'un système d'essai par un élément d'essai ou par un autre système introduit par inadvertance et qui corrompt l'élément ou détériore le système.

Criblage à haut débit : technologie faisant appel à la miniaturisation et à la robotique, utilisée pour confronter de vastes bibliothèques de composés à un gène, une protéine, une cellule, un tissu, etc. cible isolé, en vue de sélectionner des composés sur la base d'activités ultérieures précises.

Cryopréservation : stockage de cellules et de tissus à l'état congelé, dans des conditions qui préservent leur viabilité.

Cryotube : tubes spéciaux utilisés dans la cryopréservation. Ces tubes doivent répondre à des critères particuliers, notamment rester hermétiques y compris à des températures extrêmement basses et en présence des changements extrêmes de température rencontrés au cours de la congélation et de la décongélation.

Ex vivo : qualifie les cellules, tissus et organes prélevés sur des animaux intacts en vue d'une analyse plus approfondie.

Kit d'analyse : produit prêt à l'emploi regroupant tous les éléments nécessaires à la réalisation, d'un essai, d'une analyse ou d'une étude.

Lignée cellulaire : cellules ayant subi une modification génétique qui les rend immortelles et qui, par conséquent, sont capables de se multiplier *in vitro* pendant des périodes prolongées. Il est possible de les faire croître et de les cryopréserver sous forme de dépôts dans des banques de cellules. Une lignée cellulaire, continue, est généralement plus homogène, plus stable et donc plus reproductible qu'une population hétérogènes de cellules primaires.

Matériel couvert par la propriété industrielle : matériel protégé d'une utilisation illicite par la législation (droit des brevets, copyright, droit des marques).

Phase critique : procédure ou activité particulière, définie, dans le cadre d'une étude, dont la bonne exécution est vitale à la qualité, à la validité et à la fiabilité de l'étude.

Puce à ADN : ensemble miniaturisé de sites de réaction chimique disposés dans un ordre précis et fixés sur une matrice solide, par exemple une lame de microscope. Ces puces permettent de faire correspondre à des brins d'ADN inconnus des brins connus, grâce aux règles d'assemblage des paires de bases, et d'automatiser le processus de caractérisation d'échantillons inconnus, pour sonder un échantillon biologique en vue de déterminer l'expression des gènes, le profil de marqueurs ou des séquences de nucléotides de l'ADN/ARN.

Témoin négatif : partie séparée d'un système d'essai traitée avec un élément d'essai auquel on sait que le système d'essai ne doit pas réagir. Le témoin négatif apporte la preuve que le système d'essai n'est pas réactif dans les conditions réelles de l'essai.

Témoin non traité : partie séparée non traitée d'un système d'essai conservée dans les conditions initiales de culture. Le témoin non traité fournit les données de base sur le système d'essai dans les conditions de l'essai.

Témoin positif : partie séparée du système d'essai traitée avec un élément provoquant une réaction connue du système d'essai. Le témoin positif apporte la preuve que le système d'essai est réactif dans les conditions réelles de l'essai.

Témoin traité avec le véhicule : partie séparée du système d'essai à laquelle est ajoutée le véhicule de l'élément d'essai. Le témoin traité avec le véhicule apporte la preuve que le véhicule choisi n'a pas d'influence sur le système d'essai dans les conditions réelles de l'essai.

Tissu : agrégat multicellulaire de cellules différenciées ayant des fonctions spécifiques, élément constitutif des organismes.

Toxicogénomique : étude de la façon dont les génomes répondent aux facteurs d'agression et substances toxiques de l'environnement. L'objectif est de trouver des corrélations entre les réponses toxiques aux substances toxiques et les modifications du profil génétique des objets exposés à ces substances. La toxicogénomique conjugue les nouvelles technologies de la génomique et la bioinformatique pour caractériser les mécanismes d'action des substances toxiques ou supposées telles. Actuellement, les principaux outils de la toxicogénomique sont les puces à ADN et les micro-réseaux d'ADN, utilisés pour contrôler les niveaux d'expression de centaines de milliers de gènes à la fois.

Toxicométabolomique : mesure quantitative de la réponse métabolique multiparamétrique dans le temps de systèmes vivants à des stimuli pathophysiologiques ou à des modifications génétiques par exploration systématique de la composition des fluides biologiques au moyen de la technologie RMN/reconnaissance de forme, dans le but d'associer la toxicité pour l'organe cible et les profils spectraux, et d'identifier de nouveaux marqueurs de toxicité de substitution.

Toxicoprotéomique : étude de la façon dont l'expression globale des protéines dans une cellule ou un tissu répond à des facteurs d'agression ou à des substances toxiques. Le but de la toxicoprotéomique est de mettre en évidence des corrélations entre des réponses à des substances toxiques et des modifications du profil du protéome complet des objets exposés aux substances toxiques en question.

Transfection de gènes : introduction d'ADN exogène, supplémentaire (un seul gène ou plusieurs) dans une cellule hôte.

Autres sources d'information sur les essais *in vitro*

Pages web :

1. Bonnes pratiques de culture de cellules

   http://ecvam.jrc.it/publication/index5007.html

2. Principes directeurs MIAME

   http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html

3. ECVAM

   http://ecvam.jrc.it/index.htm

4. ICCVAM

   http://iccvam.niehs.nih.gov/