

Ce rapport exprime les vues collectives d'un groupe international d'experts et ne représente pas nécessairement les décisions ou la politique officiellement adoptées par l'Organisation mondiale de la Santé

Acceptabilité des substrats cellulaires pour la production de substances biologiques

Rapport d'un
Groupe d'étude de l'OMS

Organisation mondiale de la Santé
Série de Rapports techniques
747



Organisation mondiale de la Santé, Genève 1987

ISBN 92 4 220747 0

© Organisation mondiale de la Santé, 1987

Les publications de l'Organisation mondiale de la Santé bénéficient de la protection prévue par les dispositions du Protocole N 2 de la Convention universelle pour la Protection du Droit d'Auteur. Pour toute reproduction ou traduction partielle ou intégrale, une autorisation doit être demandée au Bureau des Publications, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. L'Organisation mondiale de la Santé sera toujours très heureuse de recevoir des demandes à cet effet.

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part du Secrétariat de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

La mention de firmes et de produits commerciaux n'implique pas que ces firmes et produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

ISSN 0373-3998

IMPRIMÉ EN SUISSE

86/7122 - Schüller SA - 2500

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
1. Généralités et introduction	5
2. Questions examinées par le Groupe d'étude	7
3. Discussion et conclusions	9
3.1 Evaluation du risque en cours de recherche et de mise au point	10
3.2 Produits fabriqués par d'autres méthodes	11
3.3 Risques potentiels liés aux substances biologiques produites dans des lignées cellulaires continues	11
3.4 Conclusions générales	16
4. Recommandations	18
5. Remerciements	19
Annexe 1. ADN contaminant hétérogène	20
Annexe 2. Protéines transformantes	27

GRUPE D'ÉTUDE DE L'OMS SUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES

Genève, 18 et 19 novembre 1986

Membres

- Professeur G.L. Ada, Head, Microbiology Department, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, Australie (*Rapporteur*)
Dr. J. Chermann, Institut Pasteur, Paris, France
Dr. M.G. Deo, Director, Indian Cancer Research Centre, Bombay, Inde
Professeur M.A. Epstein, John Radcliffe Hospital, Oxford, Angleterre
Professeur H. Harris, Head, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, Angleterre
Dr H. Koprowski, Director, Wistar Institute, Philadelphie, PA, Etats-Unis d'Amérique
Dr V.A. Laškevič, Directeur adjoint, Institut de la Poliomyélite et de l'Encéphalite virale, Moscou, URSS
Dr D.R. Lowy, Chief, Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique
Dr M.A. Martin, Chief, Laboratory of Molecular Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique
Professeur T. Matuhasi, Okinaka Memorial Institute for Medical Research, Tokyo, Japon
Dr C. Morel, Directeur, Institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brésil
Dr F. Robbins, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, Etats-Unis d'Amérique (*Président*)
Dr R. Sager, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, Etats-Unis d'Amérique
Dr. C.R. Steinman, Department of Medicine, State University of New York, NY, Etats-Unis d'Amérique
Professeur K. Takatsuki, Université de Kumamoto, Kumamoto, Japon
Professeur A.J. van der Eb, Laboratoire Sylvius, Leyde, Pays-Bas
Dr Wu Min, Institut du Cancer, Académie chinoise des Sciences médicales, Beijing, Chine
Dr D. Zewdie, Institut national de la Recherche en Santé, Addis Abéba, Ethiopie (*Vice-Président*)
Dr H. zur Hausen, Centre allemand de Recherche sur le Cancer, Heidelberg, République fédérale d'Allemagne

Secrétariat

- Dr J. Doehmer, Trinity College, Dublin, Irlande (*Conseiller temporaire*)
Dr. A.J. Kingsman, University of Oxford, Oxford, Angleterre (*Conseiller temporaire*)
Dr M.P. Moyer, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, Etats-Unis d'Amérique (*Conseiller temporaire*)
Dr J.C. Petriccioni, Chef, Produits biologiques, OMS, Genève, Suisse (*Secrétaire*)
Dr A.J. Strain, Department of Paediatrics, University of Sheffield, Angleterre (*Conseiller temporaire*)

ACCEPTABILITÉ DES SUBSTRATS CELLULAIRES POUR LA PRODUCTION DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES

Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS sur les produits biologiques

Un Groupe d'étude de l'OMS sur les produits biologiques s'est réuni à Genève les 18 et 19 novembre 1986. La séance a été ouverte au nom du Directeur général par le Dr S. Litvinov, Sous-Directeur général.

1. GÉNÉRALITÉS ET INTRODUCTION

L'acceptabilité des substrats cellulaires pour la production de vaccins a soulevé une controverse dès les années 50, époque à laquelle on a décidé d'accepter les cultures primaires de cellules provenant de primates non humains pour la production de certains vaccins tels que le vaccin antipoliomyélitique. Cette décision a créé un précédent important qui a eu des répercussions sur l'analyse d'autres systèmes cellulaires. Par exemple, il a fallu plus de dix ans pour que les cellules diploïdes humaines soient acceptées comme substrats par certaines autorités nationales de contrôle, bien que toutes les données scientifiques disponibles aient démontré l'innocuité des produits qui en étaient issus.

C'est en 1978, à Lake Placid, Etats-Unis d'Amérique, que l'on a reconsidéré pour la première fois l'acceptabilité des substrats autres que les cultures primaires de cellules et les cellules diploïdes, lorsque des cellules lymphoïdes humaines (issues de lymphomes) ont été proposées comme source d'interféron- α . La principale raison ayant dicté ce choix d'une cellule maligne humaine comme substrat pour la production d'interféron était que cette substance pouvait être produite en très grande quantité, et d'une façon telle que le procédé de fabrication permette d'éliminer les contaminants cellulaires qui auraient pu poser des problèmes. Cet effort de recherche et de développement a servi de base aux méthodes élaborées depuis pour

garantir l'innocuité des produits issus de diverses autres lignées cellulaires continues.

Au fur et à mesure des progrès enregistrés ces dix dernières années dans la recherche fondamentale en biologie, et parce qu'il est apparu que les techniques de recombinaison de l'ADN (génie génétique) permettraient de mettre au point des produits biologiques impossibles à fabriquer auparavant, l'utilité des lignées cellulaires continues en tant que substrats s'est imposée. La mise au point de la technique des hybridomes a également renforcé l'intérêt suscité par ces lignées cellulaires. De ce fait, une série de réunions se sont tenues en Europe et en Amérique du Nord afin d'approfondir le sujet. Différents groupes ont alors mis au point dans ces lignées cellulaires des produits destinés à des essais cliniques, et dont certaines autorités nationales de contrôle ont commencé à approuver l'utilisation à titre expérimental. Plus récemment, des autorités nationales de contrôle ont également autorisé la mise sur le marché de certains produits (par exemple, l'interféron de cellules lymphoïdes, les anticorps monoclonaux et les vaccins antirabique et antipoliomyélitique inactivés). En outre, le Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique a approuvé en 1981 l'emploi de lignées cellulaires continues non tumorigènes et exemptes de virus pour la production du vaccin antipoliomyélitique inactivé. De fait, la tendance générale depuis 1978 a été d'adopter les lignées cellulaires continues pour la production de diverses substances biologiques. Toutefois, un groupe de consultants qui s'était réuni pour étudier l'établissement de normes OMS pour le vaccin anti-hépatite B produit par recombinaison génétique en lignées cellulaires continues, a proposé que l'OMS invite un groupe d'experts à examiner les questions liées à l'emploi de cellules eucaryotes et procaryotes dans la production de substances biologiques, notamment les risques potentiels associés à l'ADN contaminant, et à définir des directives internationales relatives à l'acceptabilité des divers substrats cellulaires et des diverses stratégies de production. C'est pourquoi le Directeur général a réuni le Groupe d'étude sur les produits biologiques pour conseiller l'OMS en la matière.

Les participants à la réunion ont analysé les documents relatifs aux données expérimentales et théoriques, analyse qui les a conduits à formuler les conclusions qui figurent à la section 3 du présent rapport. Un des grands problèmes soulevés est le risque de malignité que pourrait présenter à long terme un ADN contaminant hétérogène, en particulier s'il s'avère qu'il contient des séquences

codantes ou régulatrices potentiellement oncogènes. Ce point est réellement préoccupant, car de nombreuses personnes en bonne santé, notamment des nourrissons, seront peut-être vaccinées avec des produits issus de lignées cellulaires continues, ou les recevront de toute autre manière.

Il semble que certaines lignées cellulaires continues servant de substrats à la production de substances biologiques soient inoffensives. Par exemple, un vaccin inactivé contre la fièvre aphteuse a été préparé sur la lignée cellulaire BHK-21, et plus de 100 millions de doses en ont déjà été administrées au bétail ces 20 dernières années. L'inspection des carcasses n'a montré aucun effet nocif dû au vaccin, ce qui laisse à penser qu'il est sans danger à court terme (2 à 4 ans). Bien que l'expérience clinique que l'on a des substances biologiques produites en lignées cellulaires continues et destinées à l'homme soit plus récente, et par conséquent plus limitée que dans le cas des produits vétérinaires, il a été noté qu'environ 19 millions de doses de vaccin antipoliomyélitique inactivé produit en cellules Vero ont déjà été administrées à des enfants depuis 1983.

2. QUESTIONS EXAMINÉES PAR LE GROUPE D'ÉTUDE

Les questions étaient de deux types: tout d'abord, l'acceptabilité de la mise au point d'un produit biologique dans un nouveau système cellulaire lorsque le même produit générique est déjà fabriqué par une méthode approuvée (voir *a* ci-dessous); et deuxièmement, le degré de risque associé à certaines catégories de contaminants éventuels du produit, notamment à de l'ADN contaminant hétérogène (voir *b* à *f* ci-dessous), aux virus (voir *g* ci-dessous), et aux protéines transformantes (voir *h* ci-dessous).

Le Groupe d'étude a analysé point par point les questions suivantes:

a) Quelle position doit-on adopter concernant l'acceptabilité d'un produit issu d'une lignée cellulaire continue lorsqu'il existe déjà une autre méthode de production dans un autre système cellulaire? Par exemple, l'interféron- α peut être produit chez *Escherichia coli* et en cellules lymphoïdes humaines; le vaccin anti-hépatite B peut être produit à partir de plasma humain, par expression chez des levures, et en lignées cellulaires continues.

b) Existe-t-il une quantité absolue d'ADN par dose unitaire de produit (ou pour l'ensemble des doses dans le cas de produits

biologiques administrés en plusieurs fois) au-dessous de laquelle la probabilité d'un effet biologique est si faible qu'elle est en pratique égale à zéro? Le traitement par des nucléases permettra-t-il de renforcer l'innocuité du produit ou n'ajoutera-t-il pas simplement un problème de plus, peut-être même plus important que celui que pose l'ADN?

c) Quel type d'ADN doit-on particulièrement rechercher dans les épreuves de quantification de l'ADN dans un produit, ou lors d'une étape donnée des opérations de fabrication? Si l'on utilise des séquences régulatrices pour fabriquer la cellule recombinante, faut-il déployer des efforts particuliers pour rechercher ces séquences dans le produit? Les séquences hautement répétitives et très répandues, telles que la séquence *Alu* dans l'ADN humain, constituent-elles de bonnes sondes génétiques?

d) Les séquences virales, s'il en existe dans une lignée cellulaire donnée, doivent-elles faire l'objet d'une attention particulière ou peuvent-elles être traitées comme le reste de l'ADN cellulaire?

e) Quels sont les meilleurs modèles expérimentaux pour évaluer le potentiel transformant de l'ADN de cellules que l'on voudrait utiliser, et quelle doit être la durée des études d'évaluation?

f) Quel est l'intérêt des études de validation portant sur la capacité d'un procédé à éliminer ou à inactiver en cours de fabrication les virus ou l'ADN indésirables, par rapport aux études sur le produit final?

g) Les méthodes d'épreuve qui figurent désormais dans les normes OMS pour la caractérisation des lignées cellulaires continues conviennent-elles à la détection des virus contaminants?

h) Les lignées cellulaires continues doivent-elles être caractérisées du point de vue de leur capacité à produire des protéines transformantes? Quels sont les systèmes d'épreuve les meilleurs? Si l'on trouve des protéines transformantes, quel est le degré de risque pour la personne qui prend le produit et quelle est la teneur limite acceptable?

i) Quels critères de pureté doit-on appliquer au produit final pour avoir une bonne assurance de son acceptabilité?

3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Plusieurs caractéristiques font des lignées cellulaires continues des substrats particulièrement propices à la production d'un large éventail de substances biologiques utilisées chez l'homme. Ce sont:

- leur faible coût (par rapport aux autres substrats mammaliens comme les cellules primaires, que l'on doit soumettre à toute une batterie de tests à chaque récolte);
- le fait qu'elles évitent d'avoir recours à des primates comme source de cellules primaires pour la production;
- la possibilité de pouvoir préparer, normaliser et stocker des cellules de semence;
- la facilité qu'il y a à préparer des cultures en suspension à très grande échelle;
- leur sensibilité à l'infection par un très grand nombre de virus d'importance médicale;
- la facilité relative de la transfection à l'aide de plasmides d'ADN recombiné et du clonage ultérieur de transformants à haut rendement;
- la forte probabilité d'une bonne maturation post-traductionnelle des protéines mammaliennes codées par l'ADN transfecté, qui augmente celle d'avoir un produit dont la structure conformationnelle sera correcte;
- la sécrétion (avec ou sans manipulation génétique) de produits dans le milieu de culture.

Ces propriétés sont importantes non seulement pour la production de substances biologiques dans les pays développés, mais aussi pour faciliter le transfert de la capacité de production de vaccins vers les pays en développement, un des objectifs importants de l'OMS.

Il existe cependant des risques potentiels liés à l'utilisation chez l'homme de substances biologiques produites en lignées cellulaires continues. Avant de les décrire et de les analyser, le Groupe d'étude a passé en revue les questions d'ordre général associées à l'acceptation de toute nouvelle substance biologique.

3.1 Evaluation du risque en cours de recherche et de mise au point

Pour toute nouvelle approche, plusieurs étapes importantes marquent le passage de la théorie à la pratique. La première est une évaluation des risques que le nouveau médicament, le nouveau vaccin ou le nouveau substrat cellulaire fait ou pourrait faire courir à l'homme. Dans la plupart des pays, si ce n'est dans tous, il est nécessaire de disposer de données précliniques sur l'innocuité du nouveau médicament ou produit biologique avant de l'administrer à l'homme. En effet, des normes internationales et nationales en matière d'éthique ont été définies afin de protéger l'homme des risques excessifs que font courir les phases expérimentales de la mise au point de nouveaux produits à usage thérapeutique et prophylactique.

Avant que les produits issus de lignées cellulaires continues n'aient été approuvés pour la première fois pour un usage chez l'homme, différents comités ont évalué les bénéfices et les risques qui y étaient associés, tenant compte non seulement des données en faveur de leur innocuité, mais aussi des avantages relatifs de ces nouveaux produits par rapport aux produits existants. Avant de procéder à des études cliniques chez l'homme, ces comités ont évalué l'innocuité de chaque produit compte tenu de toutes les données disponibles, et de la possibilité d'éliminer ou d'inactiver à diverses étapes des opérations de fabrication les contaminants potentiellement dangereux. Certaines autorités nationales de contrôle ont également pris position sur l'acceptabilité des études expérimentales sur l'homme.

Ces comités d'étude clinique, et dans certains cas les autorités nationales de contrôle, ont conclu qu'il était raisonnable de procéder à des études sur l'homme pour bon nombre de produits issus de lignées cellulaires continues. Il ne semble pas que l'utilisation d'une lignée cellulaire continue fasse courir au malade un risque réel. Il serait d'ailleurs contraire à tous les principes fondamentaux de la médecine de faire courir, en connaissance de cause, un risque de cancer à des malades atteints de maladies graves ou à des gens en bonne santé, surtout qu'il existe des produits de remplacement pour de nombreuses substances actuellement produites en lignées cellulaires continues, ou qui le seront bientôt. Jusqu'ici, l'impression générale des groupes qui ont étudié ces questions est que, quels qu'aient pu être les risques potentiels, les données en faveur de l'innocuité de ces produits justifient leur acceptation. Néanmoins, il

faut rester attentif aux risques inattendus et envisager le suivi à long terme des groupes de receveurs de ces nouveaux produits, au fur et à mesure qu'ils sont introduits dans l'usage courant. Compte tenu de toutes ces considérations, le Groupe d'étude a conclu qu'il faut se prononcer sur l'innocuité d'un produit issu de lignées cellulaires continues au moment d'approuver le premier essai clinique, et que ce premier jugement ne doit être modifié que si des données nouvelles importantes apparaissent par la suite.

3.2 Produits fabriqués par d'autres méthodes

Le Groupe d'étude a également examiné l'acceptabilité d'emploi des lignées cellulaires continues pour des produits comme l'interféron- α , le vaccin antipoliomyélitique et le vaccin anti-hépatite B, qui peuvent être produits par d'autres méthodes. L'individu comme la société sont en permanence confrontés à des choix qui mettent en jeu le rapport innocuité/avantages. Le choix d'options raisonnablement sûres parmi plusieurs possibilités a joué un rôle clé dans l'histoire de la mise au point des produits biologiques, notamment lorsqu'il s'est agi de savoir quelles souches de virus et substrats cellulaires devaient être utilisés pour la production de vaccins.

Le Groupe d'étude a conclu que, lorsque l'on dispose de données fiables confirmant l'innocuité d'un produit issu d'une lignée cellulaire continue, ce produit doit être considéré comme acceptable. L'existence d'un procédé de fabrication approuvé pour le même produit dans un autre système cellulaire ne doit pas entrer en ligne de compte pour accepter ou rejeter un produit obtenu en lignée cellulaire continue; chaque produit ne doit être apprécié qu'en fonction de son innocuité et de son efficacité propres.

3.3 Risques potentiels liés aux substances biologiques produites en lignées cellulaires continues

Les principaux risques potentiels associés à l'utilisation de substances biologiques produites en lignées cellulaires continues se rangent dans trois catégories: ADN contaminant hétérogène, virus, et protéines transformantes. On trouvera ci-après un résumé de l'évaluation des risques associés à chacune de ces catégories. Des analyses plus complètes sur l'ADN contaminant hétérogène et les protéines transformantes figurent respectivement dans les annexes 1 et 2.

3.3.1 ADN contaminant hétérogène

Compte tenu des données expérimentales disponibles, le Groupe d'étude a conclu que le risque associé à de l'ADN contaminant hétérogène dans un produit issu d'une lignée cellulaire continue est négligeable lorsqu'il n'y en a pas plus de 100 pg par dose unitaire pour voie parentérale. L'évaluation de l'innocuité de n'importe quel produit en ce qui concerne l'ADN devrait tenir compte: *a*) de l'élimination de l'activité biologique de l'ADN lors des différentes étapes de la fabrication du produit; et *b*) de la réduction de la quantité d'ADN en cours de fabrication, lors de l'étape de purification du produit. Un produit donné peut être considéré comme inoffensif si l'on dispose de données fiables relatives à l'un ou l'autre de ces processus ou à leur combinaison. En raison de la probabilité extrêmement faible que 100 pg d'ADN contaminant hétérogène par dose unitaire de produit pour voie parentérale exerce un quelconque effet biologique, le traitement des produits par des nucléases en cours de fabrication ajouterait probablement plus de problèmes qu'il n'en résoudrait.

L'emploi de séquences d'ADN spéciales, comme les séquences virales régulatrices, dans la construction de cellules recombinées est considéré comme acceptable, car rien ne permet de penser que ces séquences fassent courir un autre risque que celui associé à un ADN cellulaire contaminant hétérogène en général. Néanmoins, le procédé de fabrication doit apporter la preuve que ces séquences ne sont pas concentrées dans la récolte brute ou à d'autres étapes. Il est toutefois prévisible que les produits de recombinaison de l'ADN seront hautement purifiés et que la quantité d'ADN par dose sera inférieure à 100 pg; dans certains cas elle sera même indécélable.

Lorsqu'un produit est susceptible d'être contaminé par de l'ADN ayant une forte activité biologique, il faudra essayer de déceler celui-ci au moyen de techniques appropriées, dont certaines sont mentionnées dans l'annexe 1. Des techniques nouvelles de détection de l'ADN sont à l'étude.

On a employé pendant de nombreuses années des agents d'inactivation virale dans la préparation de vaccins anti-poliomyélitiques, antirabiques et anti-hépatite B efficaces et inoffensifs. Certaines données laissent à penser que ces agents d'inactivation virale peuvent également détruire l'activité biologique de l'ADN et renforcer ainsi l'innocuité de ces produits, même si la quantité d'ADN par dose unitaire pour voie parentérale est

supérieure à 100 pg. Toutefois, le Groupe d'étude a conclu qu'il était nécessaire de disposer de davantage de données exactes sur les effets de ces agents d'inactivation dans les conditions de fabrication, pour pouvoir tirer des conclusions définitives quant à leur potentiel d'inactivation de l'ADN.

3.3.2 Virus

Le Groupe d'étude a passé en revue le risque potentiel que présentent pour les receveurs les produits fabriqués dans des cellules hébergeant des agents viraux. Ces agents peuvent être des virus complets dont les modes de répllication sont connus, comme le virus SV 40, des particules virales comme les rétrovirus de type A que l'on peut voir en microscopie électronique, et des génomes ou des parties de génomes viraux persistants, comme par exemple ceux du virus de l'hépatite B et ceux du virus d'Epstein-Barr. Les cellules peuvent être divisées en trois catégories de risque selon leur propension à héberger des agents viraux pathogènes pour l'homme:

- Haut risque: Cellules sanguines et de moelle osseuse d'origine humaine ou provenant de primates; cellules de caprins et d'ovins; hybridomes lorsqu'un au moins des éléments de la fusion est d'origine humaine ou provient d'un primate.
- Risque modéré: Cellules mammaliennes non hématogènes telles que fibroblastes et cellules épithéliales.
- Faible risque: Lignées de cellules diploïdes humaines et cellules provenant de tissu aviaire.

En établissant ces distinctions en fonction du risque, on a noté les points suivants:

a) Les lymphocytes et macrophages humains peuvent être porteurs de virus latents, comme les rétrovirus humains, qui peuvent être activés si ces cellules sont exposées à des activateurs de croissance lorsqu'on les cultive *in vitro*. Du fait de l'existence de rétrovirus simiens infectieux pour les cellules humaines, les cellules hématogènes provenant de primates non humains appartiennent au groupe à haut risque. Si l'on emploie des cultures primaires de leucocytes humains pour la production d'interféron ou d'autres substances biologiques, il doit être prouvé que le procédé de fabrication inactive les rétrovirus humains connus. En outre, il

importera de dépister dans les produits fabriqués en cellules non hématogènes de primates les virus pathogènes pour l'homme et connus pour être abrités par l'espèce d'où proviennent ces cellules. On a souvent montré que les cellules de caprins et d'ovins étaient contaminées par des lentivirus et des «virus lents» associés à des encéphalopathies spongiformes subaiguës.

b) On a utilisé ces 20 dernières années des cultures primaires de cellules rénales de singe pour produire des millions de doses de vaccin antipoliomyélitique, et s'il est vrai qu'on a découvert dans ces cellules des virus latents tels que le SV 40, des mesures de contrôle ont été introduites afin d'éliminer tout risque associé à la fabrication de vaccins dans des cellules contenant ces virus endogènes. Des contrôles supplémentaires pourront s'avérer nécessaires au fur et à mesure qu'on découvrira de nouveaux virus.

c) Des lignées continues de cellules non hématogènes d'origine humaine ou provenant de primates peuvent contenir des virus ou avoir des gènes viraux intégrés dans leur ADN. Dans les deux cas, l'expression virale peut apparaître en culture *in vitro*.

d) Les tissus et cellules de rongeurs et d'oiseaux sont bien connus pour contenir des virus, mais rien ne permet de penser qu'il y a transmission de maladies à l'homme par des produits de cette origine. Par exemple, de grandes quantités de vaccins contre la fièvre jaune et la rougeole et de vaccins antigrippaux vivants sont produites depuis de nombreuses années sur des œufs embryonnés contenant des virus de la leucose aviaire, mais rien ne laisse à penser que ces produits aient eu un quelconque effet dangereux au cours de ces longues années d'utilisation chez l'homme. En revanche, le virus de la chorioméningite lymphocytaire et les virus des fièvres hémorragiques abrités par des rongeurs ont provoqué chez l'homme des maladies par infection directe.

e) On emploie des fibroblastes diploïdes humains pour la production de vaccins depuis plus de 10 ans, et bien que l'on se soit inquiété au début de savoir si ces cellules pouvaient contenir un virus humain latent, aucune trace n'en a été trouvée, et les vaccins produits à partir de ce type de cellules se sont révélés sans danger.

Le Groupe d'étude, prenant en compte cette classification des cellules selon leur potentiel de transmission de virus pathogènes pour l'homme, a convenu de l'existence de différents degrés de risque, et par conséquent de contrôle, pour les produits fabriqués à partir des différents types cellulaires mentionnés.

Néanmoins, il a mis l'accent sur le fait que lorsqu'on utilise des lignées de cellules diploïdes ou des lignées cellulaires continues, il faut employer un système de lots de semence, dont les cellules doivent être caractérisées comme il est spécifié dans les normes OMS correspondantes. L'identification de virus, de viroïdes et de structures semblables doit constituer une partie importante de la caractérisation de ces banques cellulaires. Par exemple, la présence possible d'un ARN contaminant de type viroïde, comme l'agent Delta, doit faire l'objet d'une attention particulière et doit être détectée à l'aide de méthodes appropriées.

Lorsque l'on cherche à dépister des virus dans des lignées cellulaires de rongeurs ou d'oiseaux il faut privilégier dans l'évaluation du risque les résultats d'études dans lesquelles on essaie de transmettre ces virus à des cellules cibles ou à des animaux. Le risque pour les receveurs humains ne doit pas être évalué *uniquement* à partir de la mise en évidence d'agents viraux dans l'ultrastructure cellulaire.

Il se peut qu'il y ait des agents microbiens inconnus pour lesquels on ne dispose aujourd'hui d'aucun moyen de détection. Toutefois, au cours de la longue histoire de l'utilisation des animaux, des tissus et des cellules pour fabriquer des produits destinés à l'homme, les rares cas de contamination virale décelés ont tous été dus à l'activation de virus latents connus, soit dans le matériel de départ, soit dans le produit, plutôt qu'à des «nouveaux» agents qui auraient transmis la maladie à l'homme.

Le Groupe d'étude souligne qu'il importe de vérifier l'aptitude d'un procédé de fabrication à éliminer ou à inactiver les virus qui peuvent présenter un danger pour l'homme, lorsque les cellules ou les lignées cellulaires qui les hébergent sont utilisées dans la fabrication de produits biologiques à usage médical. Comme pour l'ADN contaminant hétérogène, il faut réserver une importante marge de sécurité dans tout procédé d'inactivation ou de purification. En outre, les cellules provenant d'hommes ou d'animaux atteints de maladies inconnues et les cellules animales susceptibles de contenir des «virus lents» ne doivent pas être employées pour produire des substances biologiques destinées à l'homme.

3.3.3 Protéines transformantes

Le risque apparent lié aux protéines codées par des oncogènes se limite aux facteurs de croissance, puisque ce sont les seules protéines de ce type capables d'exercer leurs effets biologiques par l'intermédiaire de la surface cellulaire. Ces facteurs de croissance peuvent être sécrétés par des cellules employées pour la production de substances biologiques, mais les risques qu'ils font courir sont limités, puisque la stimulation de la croissance qu'ils provoquent est généralement transitoire et réversible, qu'ils ne se répliquent pas, et que beaucoup d'entre eux sont rapidement inactivés *in vivo*.

D'ordinaire, les facteurs de croissance ne semblent pas oncogènes. Etant donné les concentrations auxquelles les facteurs de croissance connus sont sécrétés par les cellules en culture, il faudrait d'abord qu'ils soient concentrés à partir du milieu de culture avant de pouvoir être biologiquement actifs *in vivo*. Toutefois, dans des cas exceptionnels, ces facteurs de croissance peuvent contribuer à l'oncogenèse, mais même là, les tumeurs n'apparaîtraient qu'en cas d'administration continue.

En résumé, le Groupe d'étude n'a pas estimé que la contamination par des facteurs de croissance connus, aux concentrations auxquelles on les rencontre généralement, constituait un risque sérieux dans la préparation de produits biologiques à partir de lignées cellulaires continues.

3.4 Conclusions générales

Même s'il est possible d'indiquer une limite supérieure de contamination d'un produit fini par de l'ADN hétérogène, et même si toutes les expériences indiquent que des quantités d'un tel ADN de l'ordre de quelques picogrammes sont biologiquement inactives dans un grand nombre d'épreuves, on ne peut pas plus affirmer l'absence totale d'ADN et du risque qui lui est lié dans les produits obtenus en lignées cellulaires continues que dans les produits issus de cultures primaires de cellules et de cultures de cellules diploïdes. Toutefois, on estime que la probabilité pour qu'un ADN provenant de lignées cellulaires continues ou d'autres systèmes cellulaires induise une tumeur maligne ou d'autres affections est extrêmement faible. En outre, il existe des méthodes éprouvées pour préparer des produits exempts de danger. Par exemple, il a été possible de préparer un vaccin sûr contre l'hépatite B à partir du sang de malades infectés,

grâce à des méthodes de purification et d'inactivation appropriées, en dépit des très hauts risques que présente cette source de matériel. De nombreuses autorités nationales de contrôle ont approuvé ces vaccins anti-hépatite B parce que des résultats fiables ont montré que les procédés de fabrication donnent des produits sûrs et efficaces répondant aux normes de l'OMS.

On a insisté sur l'importance qu'il y a à valider l'efficacité avec laquelle les diverses étapes d'un procédé de fabrication inactivent et/ou éliminent tout matériel indésirable tel qu'ADN cellulaire et virus. Il est impératif de valider la capacité d'un procédé à donner un produit répondant à certaines spécifications et d'uniformiser ce procédé de façon à obtenir une substance biologique acceptable à partir de lignées cellulaires continues. Une fois qu'un procédé a été validé et que la régularité de la production a été démontrée, des tests limités, appropriés à chaque produit, doivent suffire; cela s'est pratiqué couramment avec les substances biologiques par le passé. Il a été noté que cette démarche correspondait à l'approche proposée par les normes OMS relatives au vaccin contre l'hépatite B produit par des techniques de génie génétique.

Le Groupe d'étude a conclu qu'en général les lignées cellulaires continues sont des substrats acceptables pour la production de substances biologiques, mais qu'il faut tenir compte des différences de nature des produits et de caractéristiques des procédés de fabrication lorsqu'on décide de l'acceptabilité d'un produit donné. Il n'y a par conséquent aucune raison d'exclure les lignées cellulaires continues en tant que substrats destinés à la production de substances biologiques. A cet égard, le Groupe est en accord avec les décisions prises jusqu'ici par les comités pour n'approuver l'emploi de divers produits issus de lignées cellulaires continues que lorsqu'il était démontré à leur satisfaction que le procédé de fabrication en question donnait un produit ne présentant aucun risque décelable pouvant être attribué au substrat cellulaire.

En plus des produits déjà disponibles, bon nombre de substances biologiques seront peut-être produites dans les lignées cellulaires continues. On peut actuellement les grouper en gros en trois catégories: vaccins, protéines biologiquement actives, et anticorps monoclonaux. La fréquence d'administration et les doses employées peuvent considérablement varier selon la catégorie et au sein d'une même catégorie, ce qui souligne une fois encore l'importance qu'il y a à tenir compte des caractéristiques propres à chaque produit telles que la dose, la voie d'administration et la fréquence

d'administration, lorsqu'on évalue la capacité d'un procédé de fabrication à donner un produit sûr.

Les risques liés à l'ADN contaminant hétérogène ont été considérés comme négligeables pour les préparations administrées par voie orale. Pour ces produits, le premier impératif est d'éliminer les virus contaminants et les protéines toxiques. Si l'on observe les principes de fabrication préconisés par le Groupe d'étude pour les produits à usage parentéral, le risque lié à l'administration orale de ces produits s'en trouve grandement diminué.

4. RECOMMANDATIONS

1. L'OMS devrait promouvoir la mise en place de plusieurs banques de cellules de semence pour les lignées cellulaires continues afin d'aider les Etats Membres et les fabricants, le cas échéant, à constituer des banques de cellules de travail conformes aux normes de l'OMS relatives aux lignées cellulaires continues utilisées pour la production de substances biologiques.

2. L'OMS devrait prendre toutes les dispositions nécessaires pour encourager le remplacement des substances biologiques provenant de tissus nerveux par des substances issues directement de cultures cellulaires, notamment de lignées cellulaires continues, ou obtenues par des techniques de recombinaison de l'ADN (génie génétique).

3. L'OMS devrait encourager et coordonner les études visant à déterminer l'effet de divers agents d'inactivation, tels que la propiolactone et le formol, sur l'activité biologique de l'ADN.

4. Les autorités nationales de contrôle devraient envisager de mettre en place des groupes pluridisciplinaires qui les aideraient à évaluer l'innocuité et l'acceptabilité des substances produites par les biotechnologies modernes, puisque celles-ci font appel à des domaines souvent nouveaux et complexes, et réclament donc l'expertise collective de spécialistes appartenant à diverses disciplines.

5. Le Groupe d'étude est conscient de ce que les questions examinées dans ce rapport, notamment la genèse des tumeurs malignes humaines, appartiennent à des domaines de la recherche qui évoluent rapidement. Par conséquent, il recommande que le Secrétariat de l'OMS suive de près les progrès réalisés, et il prie le Directeur général de réunir des groupes de scientifiques en temps opportun.

5. REMERCIEMENTS

Le Groupe d'étude remercie pour leur contribution remarquable à son travail les membres suivants du personnel de l'Organisation mondiale de la Santé et du Centre international de Recherche sur le cancer: Dr F. Assaad, Directeur de la Division des Maladies transmissibles, OMS, Genève, Suisse; Dr J. Dunne, Chef du Service des Préparations pharmaceutiques, OMS, Genève, Suisse; Dr J. Esparza, Services d'Appui en Microbiologie et Immunologie, OMS, Genève, Suisse; Dr Y. Ghendon, Services d'Appui en Microbiologie et Immunologie, OMS, Genève, Suisse; Dr V. Grachev, Produits biologiques, OMS, Genève, Suisse; Dr R. Montesano, Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon, France; Dr Y. Pervikov, Services d'Appui en Microbiologie et Immunologie, OMS, Genève, Suisse; et Dr P. Sizaret, Produits biologiques, OMS, Genève, Suisse.

ADN CONTAMINANT HÉTÉROGÈNE

Le risque principal associé à l'ADN contaminant hétérogène dans les préparations biologiques destinées à l'homme tient à son activité pathogène potentielle. Après avoir examiné les données disponibles et les calculs du potentiel d'induction de tumeurs de diverses concentrations d'ADN résiduel, le Groupe d'étude a conclu que le risque lié à l'ADN contaminant hétérogène est négligeable lorsque cet ADN est présent à des concentrations inférieures à 100 pg par dose unitaire pour voie parentérale. Cette valeur a été déterminée d'après des résultats expérimentaux obtenus lors d'épreuves dans lesquelles l'activité pathogène des séquences d'ADN a été mesurée chez des animaux sensibles. Les séquences d'ADN suivantes ont été examinées:

- ADN de virus oncogènes, notamment du virus du polyome, du SV 40, des adénovirus et du virus du sarcome de Rous;
- ADN cloné du génome du virus de l'hépatite B;
- ADN chromosomique de cellules tumorales et gènes mutants *c-ras* clonés.

ADN de virus oncogènes, notamment du virus du polyome, du SV 40, des adénovirus, et du virus du sarcome de Rous

Cet ADN viral, injecté à des animaux d'expérience, est faiblement oncogène (tableau 1). Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante:

Virus du polyome

L'injection de 0,5 à 2 µg d'ADN de virus du polyome à des hamsters ou des rats nouveau-nés a entraîné l'induction de tumeurs chez 10 à 80% des animaux (1-3).

Virus SV 40

L'injection sous-cutanée de 1 à 2 µg d'ADN de SV 40 à des hamsters nouveau-nés a provoqué l'apparition de sarcomes chez 33 à 55% des animaux (2, 4).

Tableau 1. Tumorigénicité de l'ADN de virus oncogènes chez les animaux

Source	ADN		Animaux d'épreuve	Voie d'inoculation	Induction tumorale*	Référence
	Quantité(µg)					
Virus du polyome	0,5		Hamster nouveau-né	i.p.	10% (5/52)	1
	1		Hamster nouveau-né	s.c.	11% (2/22)	3
	2		Rat nouveau-né	s.c.	60% (33/55)	2
	0,2		Rat nouveau-né	s.c.	22% (2/9)	2
	2 ^b		Hamster nouveau-né	s.c.	80% (4/5)	2
	1-2		Hamster nouveau-né	s.c.	33% (11/33)	4
SV 40	2		Hamster nouveau-né	s.c.	55% (4/7)	2
	2 ^c		Hamster nouveau-né	s.c.	53% (9/17)	2
	1-10 (ADN subgénomique)		Hamster nouveau-né	s.c.	0% (0/131)	11
Adénovirus SA 7	3		Hamster nouveau-né	s.c.	28% (7/25)	5
	5		Hamster nouveau-né	s.c.	30% (24/82)	6
	2,5		Hamster nouveau-né	s.c.	7% (4/59)	6
Adénovirus humain 12	4		Hamster nouveau-né	s.c.	4% (2/50)	7
Virus du sarcome de Rous (v-src)	2		Poulet	membrane alaire	65% (11/17)	8

*Pourcentage d'animaux chez qui des tumeurs se sont développées; le nombre réel est donné entre parenthèses.

^bCe plasmide n'exprimait que la protéine T-intermédiaire du virus du polyome. Les périodes de latence de l'induction tumorale étaient 5 à 10 fois plus longues qu'avec l'ADN du virus du polyome de type sauvage. Le gène T-intermédiaire n'a pas induit de tumeurs chez le rat nouveau-né.

^cAssociation de gènes codant pour l'antigène grand T du SV 40 et pour l'antigène petit T du virus du polyome.

Adénovirus

Des doses de 3 à 5 µg d'ADN d'adénovirus simien 7 (SA 7) induisaient des tumeurs chez les hamsters nouveau-nés ou âgés de 21 jours (5, 6). L'injection de 4 µg d'ADN d'adénovirus humain 12 à des hamsters nouveau-nés ou d'une quantité équivalente du fragment d'ADN transformant cloné a provoqué la formation de tumeurs chez 2 animaux sur 50 (7).

Virus du sarcome de Rous

L'injection dans la membrane alaire du poulet de 2 µg d'un fragment d'ADN proviral subgénomique du virus du sarcome de Rous, contenant le gène viral *src*, a induit des tumeurs chez 65% des animaux (8). Ces tumeurs régressaient au bout de plusieurs semaines.

Ces résultats et d'autres indiquent que l'ADN des virus oncogènes est capable d'induire des tumeurs chez les animaux, mais en général seulement lorsqu'il est injecté à des doses comprises entre 1 et 10 µg.

ADN génomique cloné du virus de l'hépatite B

L'injection intra-hépatique de 5 µg d'ADN cloné du virus de l'hépatite B à des chimpanzés a déclenché une hépatite B, mais non l'injection intraveineuse (9).

ADN chromosomique de cellules tumorales et gènes *c-ras* mutants clonés

Des expériences ont récemment été menées par plusieurs laboratoires, ou sont en cours, avec de l'ADN chromosomique provenant de cellules tumorales et avec des gènes *ras* clonés et activés, (tableau 2). Jusqu'ici, toutes les épreuves ont été négatives, que ce soit avec de l'ADN chromosomique isolé à partir de cellules cancéreuses de la vessie T24, ou avec les gènes *H-ras* ou *K-ras*, clonés et activés, du moins au cours des périodes d'observation utilisées. La quantité d'ADN injecté allait de 10 à 500 µg pour l'ADN chromosomique et de 2 à 50 µg pour les gènes *ras* clonés et activés (3, 10).

Tableau 2. Epreuves relatives à l'oncogénicité de l'ADN cellulaire contenant un gène *ras* activé et à celle de gènes *ras* clonés et activés*

Type	ADN		Animaux d'épreuve	Voie d'inoculation	Induction tumorale ^b	Référence
	Quantité (µg)					
ADN génomique T24	10	(H- <i>ras</i>)	Rat nouveau-né	s.c.	0% (0/20)	10
ADN génomique de rat EJ-6 ^c	500	(H- <i>ras</i>)	Hamster nouveau-né	s.c.	0% (0/8)	3
Chromatine de cellules T24	~1000		Singe rhésus	Intramusculaire, i.v., intracérébrale (une ou plusieurs doses)	En cours	(Food and Drug Administration, États-Unis d'Amérique)
Gènes H- ou K- <i>ras</i> clonés et activés	2-10	(K- <i>ras</i>)	Rat nouveau-né	s.c.	0% (0/10)	10
	2-10	(H- <i>ras</i>)	Rat nouveau-né	s.c.	0% (0/14)	10
	50	(H- <i>ras</i>)	Hamster nouveau-né	s.c.	0% (0/15)	3

* Dans ces épreuves les périodes d'observation n'ont pas dépassé deux ans.

^b Pourcentage d'animaux chez qui des tumeurs se sont développées; les nombres réels sont donnés entre parenthèses.

^c Les cellules de rats EJ-6 constituent une lignée de cellules embryonnaires de rat transformées par l'oncogène H-*ras* du cancer de la vessie E.J.

Calculs relatifs à la concentration d'ADN et du potentiel d'induction tumorale

Les expériences ont montré que 2 µg d'ADN de virus du polyome ou de SV 40 peuvent induire des tumeurs chez environ 50% des animaux d'épreuve. Si ces 2 µg d'ADN définissent la «dose d'induction tumorale», alors une quantité résiduelle de 100 pg d'ADN viral oncogène dans une préparation biologique correspondrait à

$$\frac{100}{2 \times 10^6} = 0,5 \times 10^{-4} \text{ dose d'induction tumorale.}$$

Cependant, l'ADN contaminant consiste généralement en un ADN chromosomique et non en un ADN viral pur. Si cet ADN chromosomique contient un oncogène activé et qu'il n'y en a qu'une copie par génome, l'oncogène ne représentera que 1/10⁶ de l'ADN total;¹ 100 pg d'ADN chromosomique contaminant hétérogène contiendront donc $100 \times 10^{-6} = 10^{-4}$ pg d'oncogène activé, ce qui correspond à

$$\frac{10^{-4}}{2 \times 10^6} = 0,5 \times 10^{-10} \text{ dose d'induction tumorale.}$$

Le risque associé à cette quantité d'ADN est si faible qu'il peut en toute sécurité être considéré comme négligeable.

Il faut tenir compte de plusieurs points lorsqu'on fait ces estimations du risque. Premièrement, tous les calculs sont fondés sur le postulat selon lequel le facteur de risque d'induction tumorale décroît linéairement avec la concentration d'ADN. Ce postulat n'est pas forcément exact, puisqu'une quantité d'ADN qui n'a aucun effet biologique mesurable lors d'un essai normalisé parce qu'elle est présente à une trop faible concentration, peut quand même avoir un effet dans certaines conditions ou sur certains organes ou tissus. Deuxièmement, on ignore encore si le risque associé à des expositions répétées à de l'ADN agira de façon cumulative ou non. Troisièmement, il faut envisager la possibilité que les préparations d'ADN qui n'induisent pas de tumeurs dans les systèmes expérimentaux puissent provoquer chez l'homme des modifications

¹ Si la quantité d'ADN génomique par cellule a pour masse 10 pg et qu'un oncogène mesure 10 kilobases (= 10⁻⁵ pg), alors l'oncogène représentera 1/10⁶ du génome.

susceptibles d'accroître l'incidence de l'apparition de tumeurs après de longues périodes de latence. Quatrièmement, les expériences conduites sur des animaux à courte durée de vie ne permettent pas d'évaluer les effets à long terme des séquences d'ADN acquises.

Quantification de l'ADN contaminant hétérogène ou des séquences oncogènes

Dans les substances biologiques, la quantité d'ADN cellulaire résiduel est généralement mesurée par des techniques d'hybridation des acides nucléiques. On a utilisé pour ces épreuves les sondes suivantes:

a) Des séquences spécifiques d'espèce hautement répétitives qui se retrouvent en grand nombre dans le génome cellulaire, comme les séquences *Alu* de l'ADN humain.

b) Les séquences géniques spécifiques particulièrement intéressantes et dont on connaît la présence dans la cellule, comme celles d'un virus ou d'un oncogène donnés.

En outre, il peut être utile de disposer d'une technique qui puisse déceler l'ADN en général, quelle que soit sa séquence.

Bibliographie

1. ISRAËL, M.A. ET AL. Biological activity of polyoma viral DNA in mice and hamsters. *Journal of virology*, **29**: 990-996 (1979).
2. BOUCHARD, L. ET AL. Tumorigenic activity of polyoma virus and SV40 virus DNAs in newborn rodents. *Virology*, **135**: 53-64 (1984).
3. MUFSON, R.A. & GESNER, T. Lack of tumorigenicity of cellular DNA and oncogene DNA in newborn hamsters. *In vitro monograph*, **6**: 168 (1985).
4. SOL, C.J.A. & VAN DER NOORDAA, J. Oncogenicity of SV40 DNA in the Syrian hamster. *Journal of general virology*, **37**: 635-638 (1977).
5. BURNETT, J.P. & HARRINGTON, J.A. Simian and adenovirus SA₇ DNA: chemical, physical and biological studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **60**: 1023-1029 (1968).
6. BURNETT, J.P. ET AL. Retention of tumour-inducing capacity by adenovirus DNA after cleavage by restriction endonucleases. *Nature (London)*, **254**: 158-159 (1975).
7. JOCHEMSEN, H. *Studies on the transforming genes and their products of human adenovirus types 12 and 5*. Université de Leyde, 1979 (Thèse de doctorat).
8. FUNG, Y-K.T. ET AL. Tumor induction by direct infection of cloned v-src DNA into chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**: 353-357 (1983).
9. WILL, H. ET AL. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature (London)*, **299**: 740-742 (1980).

10. LEVINSON, A.D. ET AL. Tumorigenic potential of DNA derived from mammalian cell lines. *In vitro monograph*, 6: 161-165 (1985).
11. MOYER, M.P. & MOYER, R.C. The effect of oncogenes inoculated into hamsters. *In vitro monograph*, 6: 140-147 (1985).

PROTÉINES TRANSFORMANTES

Les protéines codées par les gènes cellulaires transformants (*c-onc*) ou par leurs versions mutées peuvent induire la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires différents. Certaines protéines onc exercent leurs effets biologiques depuis l'extérieur de la cellule, mais la plupart ne sont actives qu'au niveau intracellulaire. Les gènes *onc* ont été décelés pour la première fois dans des rétrovirus hautement transformants (1, 2). Les séquences des homologues cellulaires (*proto-onc*) des oncogènes de rétrovirus ont été très bien conservées au cours de l'évolution, et sont les mêmes chez les invertébrés et chez l'homme. De nombreux *proto-onc* semblent n'avoir que peu ou pas de pouvoir oncogène. Toutefois, lorsqu'ils sont insérés dans un rétrovirus vecteur, certains au moins des *proto-onc* ayant une régulation défectueuse ou des gènes portant des mutations structurelles possèdent un potentiel oncogène semblable à celui des oncogènes viraux.

Les profondes altérations de la croissance cellulaire que ces gènes peuvent induire sont à l'origine des questions que l'on se pose quant au risque tumorigène lié à la contamination, par des oncogènes ou par les protéines qui en sont issues, de produits obtenus en cultures cellulaires et administrés à l'homme. Quels sont alors les dangers théoriques et réels que peuvent faire courir les protéines codées par les oncogènes? On a déjà examiné les problèmes potentiels posés par la contamination par les *proto-onc* normaux ou mutés (3). Dans la présente analyse, le terme d'oncogène comprend tout gène codant pour un produit capable de stimuler directement la prolifération cellulaire. Cette définition permet de traiter des facteurs de croissance, qui n'auraient pu être évoqués dans le cadre d'une définition plus étroite (4, 5).

Risques théoriques comparés: ADN/protéines

Outre les différences chimiques évidentes qui existent entre acides nucléiques et protéines, on peut faire au moins deux distinctions qualitatives importantes entre les gènes et leurs produits, distinctions directement liées à leur potentiel oncogène. On pense que la transformation maligne représente une modification plus ou moins

irréversible de la cellule au stade prolifératif. L'administration involontaire d'un ADN oncogène pourrait théoriquement provoquer des modifications reproduisant ce processus si ce gène était intégré par la cellule, puisqu'une acquisition permanente de cet ADN le mènerait à exprimer de manière constitutive sa protéine onc. L'introduction du gène transformant peut par conséquent provoquer une modification génotypique irréversible dans la cellule, qui se traduit par son exposition permanente à la protéine onc en un site biologique précis, extracellulaire ou intracellulaire. Par contre, l'administration involontaire d'une protéine est théoriquement moins dangereuse puisque, contrairement à l'ADN, elle ne possède pas la faculté de s'autorépliquer. Ses effets seront donc probablement strictement limités par la quantité administrée, et ne dureront qu'aussi longtemps que la protéine restera biologiquement active.

Une deuxième grande différence réside dans le fait que les protéines onc administrées ne peuvent être actives que si elles exercent leurs effets biologiques par l'intermédiaire de la surface cellulaire; en effet, l'absorption par la cellule de protéines onc administrées par les techniques courantes est en soi tellement inefficace qu'elles ne pourraient pas, même théoriquement, atteindre des concentrations intracellulaires suffisantes pour être biologiquement actives (6). Cela signifie que la plupart des protéines onc ne constituent pas des contaminants potentiellement oncogènes, puisque la plupart d'entre elles sont actives au niveau intracellulaire et non extracellulaire. Par conséquent, on ne s'intéressera ici qu'aux protéines onc actives au niveau extracellulaire. Cependant, les principes généraux qui vont suivre s'appliqueraient aussi à l'étude des risques potentiels présentés par des protéines onc agissant au niveau intracellulaire, au cas où elles seraient administrées dans des conditions favorisant leur absorption cellulaire sous une forme biologiquement active, par exemple dans des liposomes.

Facteurs de croissance

Les protéines onc capables d'induire la prolifération à partir du milieu extracellulaire sont en général désignées au plan générique sous le nom de facteurs de croissance peptidiques (7). Le facteur de croissance plaquettaire est le type même de ce groupe de molécules pouvant envoyer un signal déclenchant la stimulation de la croissance à partir du milieu extracellulaire (8, 9). Ce groupe

comprend également le facteur de croissance épidermique, le facteur de croissance transformant alpha qui lui est étroitement apparenté, le facteur de croissance transformant bêta, le facteur de croissance des fibroblastes, l'insuline, les somatomédines (facteurs de croissance de type insuline), la transferrine et le peptide (de type bombésine) responsable de la libération de la gastrine. Ces facteurs de croissance peuvent également comprendre des molécules que l'on croyait au début dépourvues de propriétés prolifératives, telles que le facteur de nécrose tumorale (10). Ils peuvent être dosés soit biologiquement à l'aide de cellules sensibles, soit par titrage radio-immunologique.

Le virus du sarcome simien est le seul rétrovirus transformant dont on sait que l'oncogène *v-sis* code pour un facteur de croissance; *v-sis* provient de l'un des deux gènes codant pour le facteur de croissance plaquettaire. A l'inverse des produits protéiniques de plusieurs gènes transformants cellulaires actifs dans le milieu intracellulaire, on n'a jamais décrit de version activée d'un facteur de croissance plaquettaire, ni d'autres facteurs de croissance ayant des propriétés prolifératives plus importantes que les versions normales. En particulier, *v-sis* n'a pas une plus grande activité transformante que son proto-*onc* cellulaire. Les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance plaquettaire peuvent, dans un contexte physiologique, (comme par exemple lors de la cicatrisation d'une blessure ou lors de la formation du caillot qui l'accompagne), être présents localement à des concentrations suffisamment élevées pour induire une prolifération cellulaire en réponse à une lésion. Il importe de noter que les effets de ces facteurs de croissance sont réversibles et que ces derniers ne sont pas connus pour être particulièrement mutagènes. L'administration involontaire de facteurs de croissance contaminants représenterait une exposition à des produits exprimés par des cellules normales dans certaines situations physiologiques déterminées. Des tumeurs ne pourraient apparaître qu'après administration de doses «pharmacologiques» (c'est-à-dire non physiologiques) répétées, et elles arrêteraient probablement de se développer dès l'interruption du traitement.

Chaque facteur de croissance transmet son signal propre par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques situés sur la surface cellulaire. Par conséquent, il n'agira que sur les cellules disposant des bons récepteurs. Pour de nombreux facteurs de croissance, ces récepteurs ne se trouvent que dans un certain type de cellules. Les

récepteurs du facteur de croissance transformant bêta, eux, se retrouvent théoriquement un peu partout; cette vaste répartition dans de nombreux types cellulaires différents peut être liée aux nombreuses fonctions de ce facteur de croissance, qui stimule apparemment la croissance cellulaire dans certains cas et l'inhibe dans d'autres.

Comme il est mentionné plus haut, les facteurs de croissance sont synthétisés physiologiquement par les cellules normales. Leur synthèse peut s'accroître dans divers états pathologiques, et de nombreuses cellules tumorales synthétisent de manière constitutive de grandes quantités de divers facteurs de croissance (11). On a montré que l'expression de certains oncogènes dont les protéines agissent au niveau intracellulaire stimulait la production des facteurs de croissance sécrétés. La sécrétion anormalement élevée de facteurs de croissance par les cellules tumorales qui présentent des récepteurs de ces facteurs sur leur surface cellulaire est à l'origine de l'hypothèse selon laquelle certaines tumeurs sont entretenues par un mécanisme autocrine. Le nombre élevé de récepteurs des facteurs de croissance que montrent certaines tumeurs pourrait rendre les cellules tumorales plus sensibles à une induction de la croissance par l'intermédiaire de mécanismes paracrines ou autocrines (12).

Potentiel oncogène des facteurs de croissance

Il ne semble pas que les facteurs de croissance, qu'ils soient seuls ou en association, puissent par eux-mêmes induire un phénotype entièrement tumorigène dans des cellules primaires. Toutefois, l'association de plusieurs facteurs de croissance peut rendre des cellules de rongeurs non néoplasiques connues totalement indépendantes de leur point d'ancrage, phénotype souvent fortement corrélé à la tumorigénicité chez les fibroblastes (13). Isolément, des facteurs de croissance peuvent induire l'indépendance vis-à-vis du point d'ancrage et la croissance tumorigène de certaines cellules connues (14).

Les effets oncogènes des facteurs de croissance n'ont été démontrés *in vivo* que dans des circonstances exceptionnelles. Dans une lignée de souris à forte incidence de tumeurs mammaires dont la croissance dépend en partie du facteur de croissance épidermique, l'ablation chirurgicale des glandes salivaires, qui constitue la principale source endogène de facteur de croissance épidermique, a provoqué une diminution significative de l'incidence des tumeurs

mammaires (de 62 à 12%; 15). L'administration de quantités «pharmacologiques» de facteur de croissance épidermique (5 µg par animal) tous les deux jours restaurait partiellement l'incidence normale des tumeurs (jusqu'à 33%). Ces résultats confirment que dans cette lignée de souris, la formation des tumeurs dépend en partie du facteur de croissance épidermique. Dans une autre expérience, l'inoculation conjointe à une souris nude de cellules oestrogéno-indépendantes et oestrogéno-dépendantes provenant de tumeurs mammaires de souris a rendu les secondes hormono-indépendantes, probablement en raison de la production de facteurs de croissance autostimulants (16).

Dans les exemples mentionnés ci-dessus, les facteurs de croissance se sont révélés tumorigènes dans les cas où les animaux possédaient probablement des cellules nettement anormales; l'adjonction de facteurs de croissance n'a probablement représenté qu'une des nombreuses modifications importantes qui sont à l'origine de la tumorigénèse. Le potentiel oncogène du virus du sarcome simien semble être extrêmement limité, bien que le *v-sis* soit exprimé de manière constitutive dans les cellules infectées; lorsque ce virus induit des tumeurs, il s'agit de masses fibroblastiques à croissance lente qui ne semblent pas être localement invasives, ni métastatiques (17).

Aspects quantitatifs

Bien que certains facteurs de croissance puissent être spécifiquement liés à des protéines sériques, la plupart d'entre eux ont une demi-vie extrêmement courte dans le sang (2 minutes pour le facteur de croissance plaquettaire). Une courte demi-vie limite nettement les effets potentiels *in vivo*. L'administration *in vivo* du facteur de croissance transformant alpha à des souriceaux nouveau-nés (qui y sont très sensibles) par voie sous-cutanée, à des doses quotidiennes supérieures à 0,3 µg/g de poids corporel, a accéléré la percée des incisives et l'ouverture des paupières (effets biologiques bien connus du facteur de croissance épidermique), mais n'a eu aucun effet sur la croissance (18).

Il faut en général 0,1 à 20 ng/ml de facteur de croissance pour pouvoir observer *in vitro* un effet de stimulation de la croissance significatif chez des cellules sensibles, bien que certains facteurs, comme le facteur de croissance des fibroblastes, puissent être actifs à des concentrations de quelques picogrammes par millilitre.

Même les cellules qui sécrètent de grandes quantités de facteurs de croissance n'en libèrent pas plus de 50 à 75 ng/ml dans le milieu de culture. En raison de la dilution qui s'opère dans les liquides corporels, il serait presque impossible que le surnageant non concentré ait une activité oncogène décelable *in vivo*. Toutefois, des problèmes pourraient surgir si l'on concentrait les facteurs de croissance en concentrant le produit souhaité. Il semble raisonnable de conclure provisoirement que des doses de facteur de croissance de l'ordre de 10 µg/kg de poids corporel et par jour n'auront aucun effet oncogène, même chez des individus sensibles. Il pourrait être intéressant d'approfondir l'étude du système tumoral mammaire des souris (avec ablation des glandes salivaires) avec différentes doses de facteur de croissance épidermique ou de facteur de croissance transformant alpha, afin d'obtenir des renseignements plus précis sur les risques que fait courir l'administration *in vivo* de ces facteurs de croissance à un animal très sensible.

Résumé et conclusions

Le risque théorique associé aux protéines codées par les oncogènes est limité aux facteurs de croissance, qui peuvent être sécrétés par les cellules dans lesquelles on envisage de fabriquer des produits biologiques. Parce que ces peptides ne se répliquent pas, leur effet est limité dans le temps; de plus, il est réversible. D'ordinaire, ces facteurs de croissance ne semblent pas oncogènes; même dans les situations où ils contribuent à l'oncogenèse, l'administration répétée de fortes concentrations de ces facteurs (plusieurs microgrammes par kilogramme) paraît nécessaire pour qu'ils agissent comme cofacteurs dans le processus cancérogène; de plus, le développement de la tumeur qui en résulterait semble exiger leur présence continue.

Bibliographie

1. BISHOP, J.M. Viral oncogenes. *Cell*, **42**: 23 (1985).
2. WEINBERG, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science*, **230**: 770 (1985).
3. LOWY, D.R. Potential hazards from contaminating DNA that contains oncogenes. *In vitro monograph*, **6**: 36 (1985).
4. CARPENTER, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, **48**: 194 (1979).

5. ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. Transforming growth factors. *Cancer surveys*, **4**: 683 (1985).
6. BAR-SAGI, D. & FERAMISCO, J.J. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by *ras* proteins. *Science*, **233**: 1061 (1986).
7. SPORN, M.B. & ROBERTS, A.B. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *Journal of clinical investigation*, **78**: 329 (1986).
8. DEUEL, T.F. ET AL. Platelet derived growth factor: roles in normal and v-sis transformed cells. *Cancer surveys*, **4**: 633 (1985).
9. ROSS, R. ET AL. The biology of platelet derived growth factor. *Cell*, **46**: 155 (1986).
10. KOHASE, M. ET AL. Induction of Beta₂-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*, **45**: 659-666 (1986).
11. DICKSON, R.B. ET AL. Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 β -estradiol or v-*ras*H oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (sous presse).
12. ULRICH, A. ET AL. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature (London)*, **309**: 418 (1984).
13. ASSOIAN, R.K. ET AL. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature (London)*, **309**: 804 (1984).
14. ROSENTHAL, A. ET AL. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation. *Cell*, **46**: 301 (1986).
15. KURACHI, H. ET AL. Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 5940 (1985).
16. DANIELPOUR, D. & SIRBASKU, D.A. New perspectives in hormone-dependent (responsive) and autonomous mammary tumour growth: role of autostimulatory growth factors. *In vitro*, **20**: 975 (1984).
17. DEINHARDT, F. Biology of primate retroviruses. In: Klein, G. ed. *Viral oncology*. New York, Raven Press, 1980, pp. 357-398.
18. TAM, J.P. Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. *Science*, **229**: 673 (1985).

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
SÉRIE DE RAPPORTS TECHNIQUES

<i>Rapports récents</i>		Fr. s.
N°		
684	(1983) Exposition à certaines poussières végétales: limites recommandées d'exposition professionnelle à visée sanitaire Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (93 pages)	6.—
685	(1983) L'utilisation des médicaments essentiels Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (50 pages)	4.—
686	(1983) Prévention primaire de l'hypertension essentielle Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (45 pages)	4.—
687	(1983) Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique Trente-troisième rapport (196 pages)	13.—
688	(1983) Lutte antivectorielle intégrée Septième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle (83 pages)	6.—
689	(1983) Conception rationnelle des actes de radiodiagnostic Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS sur les indications et les limites des principaux actes de radiodiagnostic (53 pages)	5.—
690	(1983) Nouvelles approches de l'éducation pour la santé dans le cadre des soins de santé primaires Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (48 pages)	4.—
691	(1983) Prévention du cancer du foie Rapport d'une réunion de l'OMS (33 pages)	3.—
692	(1983) Maladies trophoblastiques de la gestation Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (91 pages)	7.—
693	(1983) Vaccins viraux et médicaments antiviraux Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (83 pages)	6.—
694	(1983) Recherches en vue de la réorientation des systèmes de santé nationaux Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (80 pages)	7.—
695	(1983) Stratégie de lutte antitabac dans des pays en développement Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (98 pages)	8.—
696	(1983) Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants Vingt-septième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (50 pages)	5.—
697	(1984) Les Myocardiopathies Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (74 pages)	7.—
698	(1984) Les soins de santé mentale dans les pays en développement: bilan critique des résultats de la recherche Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (60 pages)	6.—
699	(1984) Pesticides: chimie et normes Huitième rapport du Comité OMS d'experts de la Biologie des Vecteurs et de la Lutte antivectorielle (51 pages)	5.—
700	(1984) Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique Trente-quatrième rapport (82 pages)	7.—
701	(1984) Les leishmanioses Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (154 pages)	11.—

702	(1984) Filariose lymphatique Quatrième rapport du Comité OMS d'experts de la filariose (129 pages)	9.—
703	(1984) Les accidents de la route dans les pays en développement Rapport d'une Réunion de l'OMS (38 pages)	5.—
704	(1984) Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques Vingt-neuvième rapport (59 pages)	6.—
705	(1984) La sécurité des produits alimentaires et son rôle dans la santé et le développement Rapport d'un Comité mixte d'experts FAO/OMS de la sécurité des produits alimentaires (92 pages)	7.—
706	(1984) Applications de l'épidémiologie à l'étude du vieillissement Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS sur l'épidémiologie du vieillissement (93 pages)	8.—
707	(1984) Exposition aux substances irritantes pour les voies respiratoires: limites recommandées d'exposition professionnelle à visée sanitaire Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (168 pages)	14.—
708	(1984) Formation des enseignants et gestionnaires infirmiers, notamment pour les soins de santé primaires Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (56 pages)	6.—
709	(1984) Comité OMS d'experts de la Rage Septième rapport (113 pages)	9.—
710	(1984) Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants Vingt-huitième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (50 pages)	5.—
711	(1985) Progrès en chimiothérapie du paludisme Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (en préparation)	
712	(1985) La lutte antipaludique dans le cadre des soins de santé primaires Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (79 pages)	8.—
713	(1984) Méthodes et programmes de prévention des affections bucco-dentaires Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (51 pages)	5.—
714	(1985) Identification et prévention des maladies liées à la profession Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (82 pages)	7.—
715	(1985) Etude de la tension artérielle chez l'enfant Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (37 pages)	5.—
716	(1985) Epidémiologie de la lèpre et lutte antilépreuse Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (64 pages)	6.—
717	(1985) Besoins en personnels en vue de l'instauration de la santé pour tous d'ici l'an 2000 sur la base des soins de santé primaires Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (102 pages)	8.—
718	(1985) Lutte contre la pollution de l'environnement associée au développement Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (69 pages)	6.—
719	(1985) Maladies virales transmises par les arthropodes et les rongeurs Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (128 pages)	10.—
720	(1985) Sécurité d'emploi des pesticides Neuvième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle (70 pages)	6.—

721	(1985) Fièvres hémorragiques virales Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (141 pages).....	10.—
722	(1985) L'utilisation des médicaments essentiels Deuxième rapport du Comité d'experts de l'OMS (56 pages).....	6.—
723	(1985) L'utilisation future des nouvelles techniques d'imagerie dans les pays en développement Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (72 pages).....	10.—
724	(1985) Besoins énergétiques et besoins en protéines Rapport d'une consultation conjointe FAO/OMS/ONU (en préparation)	
725	(1985) Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique Trente-cinquième rapport (156 pages).....	11.—
726	(1985) La mort subite d'origine cardiaque Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (27 pages).....	4.—
727	(1985) Le Diabète sucré Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (123 pages).....	9.—
728	(1985) Lutte contre la schistosomiase Rapport d'un Comité OMS d'experts (129 pages).....	10.—
729	(1985) Comité OMS d'experts de la Pharmacodépendance Vingt-deuxième rapport (34 pages).....	4.—
730	(1986) La démence du grand âge: recherche et action Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS (82 pages).....	10.—
731	(1986) Les jeunes et la santé: défi pour la société Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS sur les jeunes et la santé pour tous d'ici l'an 2000 (128 pages).....	16.—
732	(1985) La lutte communautaire contre les maladies cardio-vasculaires Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (69 pages).....	9.—
733	(1986) Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants Vingt-neuvième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (64 pages).....	10.—
734	(1986) Exposition à certaines poussières minérales (silice, charbon): limites recommandées d'exposition professionnelle à visée sanitaire Rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS (99 pages).....	12.—
735	(1986) Comité OMS d'experts du paludisme Dix-huitième rapport (118 pages).....	14.—
736	(1986) Comité OMS d'experts des maladies vénériennes et des tréponématoses Sixième rapport (152 pages).....	18.—
737	(1986) Résistance aux pesticides des vecteurs et réservoirs de maladies Dixième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle (94 pages).....	12.—
738	Réglementer la formation et l'activité du personnel infirmier pour répondre aux besoins des soins de santé primaires Rapport d'un Groupe d'études de l'OMS (85 pages).....	10.—
739	La trypanosomiase africaine: épidémiologie et lutte Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS (147 pages).....	16.—
740	Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose Sixième rapport (145 pages).....	18.—