
**Évaluation biologique des dispositifs
médicaux —**

**Partie 5:
Essais concernant la cytotoxicité in vitro**

Biological evaluation of medical devices —

Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
**iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)**

ISO 10993-5:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10993-5:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2009

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Préparation des échantillons et des contrôles	2
4.1 Généralités	2
4.2 Préparation des extraits liquides de matériau	3
4.3 Préparation du matériau pour les essais en contact direct	4
4.4 Préparation des contrôles	5
5 Lignées cellulaires	5
6 Milieu de culture	6
7 Préparation de la culture cellulaire mère	6
8 Modes opératoires d'essai	6
8.1 Nombre d'exemplaires	6
8.2 Essais à partir d'extraits	6
8.3 Essai par contact direct	7
8.4 Essai par contact indirect	8
8.5 Détermination de la cytotoxicité	9
9 Rapport d'essai	11
10 Interprétation des résultats	11
Annexe A (informative) Essai de cytotoxicité par fixation du rouge neutre (NRU)	12
Annexe B (informative) Essai de cytotoxicité par formation de colonies	19
Annexe C (informative) Essai de cytotoxicité au MTT	24
Annexe D (informative) Essai de cytotoxicité au XTT	29
Bibliographie	34

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 10993-5 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 194, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 10993-5:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 10993 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Évaluation biologique des dispositifs médicaux*:

- *Partie 1: Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque*
- *Partie 2: Exigences relatives à la protection des animaux*
- *Partie 3: Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction*
- *Partie 4: Choix des essais pour les interactions avec le sang*
- *Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro*
- *Partie 6: Essais concernant les effets locaux après implantation*
- *Partie 7: Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène*
- *Partie 9: Cadre pour l'identification et la quantification des produits potentiels de dégradation*
- *Partie 10: Essais d'irritation et de sensibilisation cutanée*
- *Partie 11: Essais de toxicité systémique*
- *Partie 12: Préparation des échantillons et matériaux de référence*
- *Partie 13: Identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères*

- *Partie 14: Identification et quantification des produits de dégradation des céramiques*
- *Partie 15: Identification et quantification des produits de dégradation issus des métaux et alliages*
- *Partie 16: Conception des études toxicocinétiques des produits de dégradation et des substances relargables*
- *Partie 17: Établissement des limites admissibles des substances relargables*
- *Partie 18: Caractérisation chimique des matériaux*
- *Partie 19: Caractérisations physicochimique, morphologique et topographique des matériaux*
[Spécification technique]
- *Partie 20: Principes et méthodes relatifs aux essais d'immunotoxicologie des dispositifs médicaux*
[Spécification technique]

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10993-5:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009>

Introduction

En raison de l'applicabilité générale des essais de cytotoxicité in vitro et de leur utilisation courante pour l'évaluation de toute une variété de dispositifs et matériaux, l'objet de la présente partie de l'ISO 10993 est de définir un schéma des essais qui nécessite la prise de décisions concernant une série de phases, plutôt que de spécifier un essai unique. Cette démarche doit mener à la sélection de l'essai le plus approprié.

Trois catégories d'essais sont répertoriées: essai d'extrait, essai par contact direct, essai par contact indirect.

Le choix d'une ou de plusieurs de ces catégories dépend de la nature de l'échantillon à évaluer, du site d'utilisation potentiel et de la nature de l'utilisation.

Ce choix détermine alors les détails de la préparation des échantillons à soumettre à essai, de la préparation des cellules cultivées et la façon dont les cellules sont exposées aux échantillons ou à leurs extraits.

L'évaluation de la présence et de la mesure de l'effet cytotoxique est entreprise à la fin de la durée d'exposition. L'intention de la présente partie de l'ISO 10993 est de laisser ouvert le choix du type d'évaluation. Une telle stratégie laisse à disposition toute une batterie d'essais et reflète l'approche de nombreux groupes qui recommandent des essais biologiques in vitro.

Les nombreuses méthodes employées et les points finaux mesurés lors de la détermination de cytotoxicité peuvent être regroupés selon les différentes catégories d'évaluation suivantes:

- évaluation des dommages cellulaires par des observations morphologiques;
- mesurages des dommages cellulaires; [ISO 10993-5:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009)
- mesurages de la croissance cellulaire;
- mesurages d'aspects particuliers du métabolisme cellulaire.

Il existe plusieurs moyens d'obtenir des résultats dans chacune de ces quatre catégories. Afin que des comparaisons avec d'autres résultats intra- et interlaboratoires sur des dispositifs ou matériaux similaires puissent être faites, il est préférable que l'investigateur connaisse les catégories d'essai à laquelle chaque technique particulière appartient. Des exemples de protocoles d'essai quantitatif sont donnés dans les annexes. Les directives d'interprétation des résultats sont données dans la présente partie de l'ISO 10993.

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —

Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10993 spécifie les méthodes d'essai d'évaluation de la cytotoxicité in vitro des dispositifs médicaux.

Ces méthodes décrivent l'incubation des cellules cultivées en contact avec un dispositif et/ou des extraits de dispositif, soit directement, soit par diffusion.

Elles sont conçues pour déterminer la réponse biologique in vitro des cellules de mammifère au moyen de paramètres biologiques adaptés.

iTeh STANDARD PREVIEW

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 10993-1, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 1: Évaluation et essais au sein d'un système de gestion du risque*

ISO 10993-12, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 12: Préparation des échantillons et matériaux de référence*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 10993-1, ainsi que les suivants s'appliquent.

3.1 récipients de culture

récipients adaptés à la culture cellulaire tels que les boîtes de Petri en verre, les flacons de culture en plastique ou les plaques multipuits et les plaques de microtitration en plastique

NOTE Dans ces méthodes, ces récipients de culture peuvent être utilisés de manière interchangeable tant qu'ils satisfont aux exigences de classe de culture tissulaire et conviennent à la culture cellulaire de mammifère.

3.2 matériau de contrôle positif

matériau qui, soumis à essai conformément à la présente partie de l'ISO 10993, induit une réponse cytotoxique reproductible

NOTE L'objet du contrôle positif est de mettre en évidence une réponse adaptée à l'essai choisi. Par exemple, des polyuréthanes stabilisés à l'étain¹⁾ ont servi de contrôles positifs pour les matériaux solides et les extraits. Des dilutions de phénol, par exemple, ont servi de contrôle positif pour les extraits. En plus des matériaux, des produits chimiques purs peuvent aussi être utilisés pour démontrer la performance du système d'essai.

3.3 blanc

véhicule d'extraction ne contenant pas l'échantillon d'essai, contenu dans un récipient identique à celui renfermant l'échantillon d'essai et soumis à des conditions identiques à ce dernier au cours de son extraction

NOTE L'objet du blanc est d'évaluer les effets trompeurs provoqués par le récipient d'extraction, le véhicule et le processus d'extraction.

3.4 matériau de contrôle négatif

matériau qui, soumis à essai conformément à la présente partie de l'ISO 10993, n'induit pas de réponse cytotoxique

NOTE L'objet du contrôle négatif est de mettre en évidence la réponse basale des cellules. Par exemple, du polyéthylène haute densité²⁾, dans le cas des polymères synthétiques, et des tiges de céramique à l'oxyde d'aluminium, dans le cas des matériaux dentaires, ont servi de contrôles négatifs.

3.5 échantillon d'essai

matériau, dispositif, partie de dispositif, composant, extrait ou partie de composant soumis à des essais ou à une évaluation biologique ou chimique

3.6 sous-confluence

environ 80 % de la confluence, c'est-à-dire la fin de la phase logarithmique de croissance

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 10993-5:2009
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-811e87125362/ISO-10993-5-2009>

4 Préparation des échantillons et des contrôles

4.1 Généralités

L'essai doit être réalisé sur

- a) un extrait de l'échantillon d'essai, et/ou
- b) l'échantillon d'essai lui-même.

La préparation des échantillons doit être conforme à l'ISO 10993-12.

Des contrôles positif et négatif doivent être incorporés à chaque essai.

1) Les polyuréthanes ZDEC et ZDBC peuvent être obtenus auprès du Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japon.

2) Le polyéthylène haute densité peut être obtenu auprès de la pharmacopée des États-Unis (Rockville, Maryland, USA) et du Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japon).

Les informations données en 1) et 2) sont données à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10993 et ne signifient nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.2 Préparation des extraits liquides de matériau

4.2.1 Principes d'extraction

Il convient que les conditions d'extraction simulent ou exagèrent les conditions d'utilisation clinique du matériau afin de définir le danger potentiel de toxicité sans induire de modifications significatives de l'échantillon d'essai telles qu'une fusion, un ramollissement ou une altération de sa structure chimique, hors de celles prévues lors de son utilisation clinique. En raison de la nature de certains matériaux (par exemple les matériaux biodégradables), une altération de la structure chimique peut se produire au cours du mode opératoire d'extraction.

NOTE La concentration de toute substance endogène ou exogène dans l'extrait, et donc la quantité de ces substances mise au contact des cellules utilisées dans l'essai, dépendent de la surface de contact, du volume d'extraction, du pH, de la solubilité chimique, de la vitesse de diffusion, de l'osmolarité, de l'agitation, de la température, de la durée et d'autres facteurs.

Pour les dispositifs impliquant un mélange de deux ou de plusieurs composants chez le patient pour obtenir le dispositif final (ciment à os), il est recommandé de ne pas rincer le dispositif final avant extraction. Le rinçage du dispositif peut faire disparaître, partiellement ou totalement, les résidus présents sur le dispositif. Si l'échantillon d'essai est destiné à une utilisation en environnement stérile, il convient d'utiliser un échantillon d'essai stérilisé pour extraire les constituants chimiques.

4.2.2 Véhicule d'extraction

Le choix du (des) véhicule(s) d'extraction tenant compte des caractéristiques chimiques du matériau doit être justifié et documenté. Pour les essais de cellules de mammifères, un ou plusieurs des véhicules suivants doivent être utilisés:

a) milieu de culture avec sérum;

b) solution saline physiologique; standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d-8cfdcf7b355/iso-10993-5-2009

c) autre véhicule adapté.

Il convient que le choix du véhicule reflète l'objectif de l'extraction. L'utilisation d'un véhicule polaire et non polaire doit aussi être prise en considération. Le milieu de culture avec sérum est le véhicule d'extraction favori. Il est préféré pour l'extraction à cause de sa capacité à soutenir la croissance cellulaire ainsi qu'à extraire des substances polaires et non polaires. En plus du milieu de culture avec sérum, il convient de considérer l'emploi de milieu sans sérum afin d'extraire spécifiquement les substances polaires (par exemple les composés ioniques). L'eau purifiée et le diméthylesulfoxyde (DMSO) sont également des véhicules adaptés. Au-delà de 0,5 % (fraction volumique), dans certains systèmes d'essai, le DMSO est connu pour être cytotoxique. La concentration d'exposition cellulaire des extractibles dans le DMSO sera inférieure à celle d'une extraction en milieu de culture avec sérum, en raison de la dilution plus importante.

NOTE 1 Différents types de sérum peuvent être utilisés (par exemple sérum fœtal, sérum bovin/du veau, sérum du veau nouveau-né) et le choix du sérum dépend du type de cellule.

NOTE 2 Il est important de ne pas oublier que le sérum/les protéines sont connus pour se lier, dans une certaine mesure, aux substances extractibles.

4.2.3 Conditions d'extraction

4.2.3.1 L'extraction doit être effectuée dans des conteneurs stériles, chimiquement inertes et fermés, en conditions d'asepsie, et en conformité avec l'ISO 10993-12.

4.2.3.2 À l'exception des circonstances indiquées ci-dessous, l'extraction doit être menée dans l'une des conditions suivantes et effectuée conformément aux caractéristiques du dispositif et à ses conditions d'utilisation:

- a) (24 ± 2) h à (37 ± 1) °C;
- b) (72 ± 2) h à (50 ± 2) °C;
- c) (24 ± 2) h à (70 ± 2) °C;
- d) $(1 \pm 0,2)$ h à (121 ± 2) °C.

Les conditions d'extraction décrites ci-dessus, qui ont servi à établir une mesure du danger potentiel pour l'estimation du risque du dispositif ou matériau, sont fondées sur des données historiques. D'autres conditions, par exemple des temps d'extraction à 37 °C rallongés ou raccourcis, stimulant l'extraction se déroulant au cours de l'utilisation clinique ou fournissant une mesure adéquate du potentiel de danger, peuvent aussi être utilisées; mais elles doivent être justifiées et documentées. Pour les dispositifs médicaux n'entrant que peu de temps (pas plus de 4 h) en contact avec la peau ou les muqueuses intactes et non implantés, cela peut comprendre des temps d'extraction inférieurs à 24 h mais supérieurs à 4 h, comme indiqué de a) à c).

Il convient que le milieu de culture cellulaire avec sérum ne soit utilisé que conformément à a) car des températures d'extraction supérieures à (37 ± 1) °C peuvent agir de façon négative sur la chimie et/ou la stabilité du sérum et d'autres constituants du milieu de culture.

Pour les échantillons d'essai polymériques, il est recommandé que la température d'extraction ne dépasse pas la température de transition vitreuse car une température plus élevée peut changer la composition du solvant d'extraction.

4.2.3.3 Si l'extrait est filtré, centrifugé ou traité par d'autres méthodes avant d'être mis en contact avec les cellules, tous ces détails doivent être consignés dans le rapport final, accompagnés des raisons des manipulations supplémentaires (voir Article 9). Tout ajustement de pH de l'extrait doit être signalé. Il convient que les manipulations de l'extrait, telles que les ajustements de pH, soient évitées parce qu'elle peuvent influencer sur le résultat.

4.3 Préparation du matériau pour les essais en contact direct

4.3.1 Les matériaux ayant des formes, des tailles ou des états physiques variés (liquide, solide, gels, etc.) peuvent être soumis à essai sans modification des essais de cytotoxicité.

Il est recommandé que l'échantillon d'essai d'un matériau solide ait au moins une surface plane. Sinon, des ajustements doivent être faits pour obtenir des surfaces planes.

4.3.2 Stérilité des échantillons d'essai

4.3.2.1 La stérilité de l'échantillon d'essai doit être prise en compte.

4.3.2.2 Les échantillons d'essai issus de dispositifs stérilisés doivent être manipulés en asepsie tout au long de la réalisation de l'essai.

4.3.2.3 Les échantillons d'essai issus de dispositifs normalement fournis non stériles mais devant être stérilisés avant utilisation doivent être stérilisés selon la méthode recommandée par le fabricant et manipulés en asepsie tout au long de la réalisation de l'essai.

Il convient que les effets des méthodes ou des agents de stérilisation sur le dispositif soient pris en compte lors de la définition de la préparation de l'échantillon d'essai avant sa mise en œuvre dans le système d'essai choisi.

4.3.2.4 Les matériaux d'essai issus de dispositifs n'ayant pas besoin d'être stérilisés avant utilisation doivent être employés tels qu'ils sont fournis et manipulés en asepsie tout au long de la réalisation de l'essai. La stérilisation de l'échantillon d'essai afin d'éviter toute contamination microbienne de la culture de cellules peut être justifiée; toutefois, le procédé de stérilisation ne doit pas modifier les propriétés du matériau d'essai.

Si des échantillons d'essai non stériles sont utilisés, il convient que l'absence de contamination bactérienne sur ceux-ci soit vérifiée car elle peut produire une fausse évaluation de la cytotoxicité.

4.3.3 Échantillons d'essai liquides

Les échantillons d'essai liquides doivent être soumis à essai

- a) par apposition directe, ou
- b) par apposition sur une matrice absorbante biologiquement inerte.

Les disques pour filtration ont été considérés comme des matrices absorbantes inertes convenables.

4.3.4 Échantillons d'essai absorbants

Le cas échéant, les échantillons d'essai absorbants doivent être imbibés de milieu de culture avant l'essai afin d'empêcher l'adsorption du milieu de culture dans le récipient d'essai.

4.4 Préparation des contrôles

Il est recommandé que les contrôles soient choisis de sorte à pouvoir être préparés selon le même mode opératoire que l'échantillon d'essai (standards.iteh.ai)

5 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires établies sont préférées et, lorsqu'elles sont utilisées, doivent être obtenues à partir de sources reconnues³⁾.

Lorsqu'une sensibilité spécifique est nécessaire, des cultures primaires, des lignées cellulaires et des cultures organotypiques obtenues directement à partir de tissus vivants ne doivent être utilisées que si la reproductibilité et la précision de la réponse peuvent être démontrées.

Si une culture mère d'une lignée cellulaire est conservée, le stockage doit se faire à -80 °C ou moins, dans le milieu de culture correspondant, en présence d'un cryoprotecteur tel que du diméthylsulfoxyde ou du glycérol. Un stockage de longue durée (plusieurs mois à plusieurs années) n'est possible qu'à -130 °C ou moins.

Seules les cellules dépourvues de mycoplasme peuvent être utilisées pour l'essai. Avant utilisation, il convient de vérifier l'absence de mycoplasme dans les cultures mères.

Il est important de contrôler régulièrement les cellules (par exemple leurs morphologie, temps de doublement, nombre de chromosomes modal) car la sensibilité dans les essais peut varier avec le nombre de passages.

Il convient d'employer les bonnes pratiques de culture cellulaire. Voir Référence [5].

3) Par exemple les lignées de cellules American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) et CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) et CCL 10 [BHK-21 (C 13)] et V-79 379A sont recommandées par les experts de l'ISO comme adaptées.

Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10993 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées s'il est démontré qu'elles conduisent aux mêmes résultats ou à des résultats meilleurs.

6 Milieu de culture

Le milieu de culture doit être stérile.

Le milieu de culture, avec ou sans sérum, doit satisfaire aux exigences de croissance de la lignée choisie.

Des antibiotiques peuvent être ajoutés au milieu, à condition qu'ils n'aient pas d'incidence négative sur les essais.

Les conditions de stockage doivent être validées.

NOTE La stabilité du milieu de culture varie avec sa composition et ses conditions de stockage.

Le milieu de culture doit être conservé à un pH compris entre 7,2 et 7,4.

7 Préparation de la culture cellulaire mère

En utilisant la lignée cellulaire et le milieu de culture choisis, préparer assez de cellules pour réaliser l'essai. Si les cellules à faire croître proviennent de cultures qui étaient stockées, éliminer le cryoprotecteur, s'il est présent. Repiquer les cellules au moins une fois avant utilisation.

Lors du repiquage, détacher et mettre les cellules en suspension par désagrégation enzymatique et/ou mécanique, selon la méthode adaptée à la lignée cellulaire.

iTeh STANDARD PREVIEW

8 Modes opératoires d'essai (standards.iteh.ai)

8.1 Nombre d'exemplaires

ISO 10993-5:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d33001e7-506a-4ddf-9c1d->

Un minimum de trois exemplaires doit être utilisé pour les échantillons d'essai et les contrôles.

8.2 Essais à partir d'extraits

8.2.1 Cet essai permet d'évaluer la cytotoxicité à la fois de façon qualitative et quantitative.

8.2.2 Dans la suspension cellulaire continuellement agitée, pipetter une aliquote et la transférer dans chacun des récipients en nombre suffisant pour réaliser l'exposition des extraits. Répartir uniformément les cellules à la surface de chaque récipient par une rotation douce.

8.2.3 Mettre les cultures à incuber à (37 ± 1) °C dans de l'air supplémenté ou non de dioxyde de carbone selon le système tampon sélectionné pour le milieu de culture.

Il est recommandé que l'essai soit réalisé sur une monocouche sous-confluente ou sur des cellules venant d'être mises en suspension.

Pour l'essai de formation de colonies, seule une densité cellulaire faible appropriée doit être utilisée.

8.2.4 Avant de commencer l'essai, vérifier la sous-confluence et la morphologie des cultures au microscope.

Dans des cas exceptionnels, il est permis d'ensemencer des cellules à croissance exponentielle (par exemple des cellules primaires, des cellules à forte prolifération) au départ de l'essai.

8.2.5 Réaliser l'essai sur

- a) l'extrait pur, et/ou
- b) l'extrait pur et une série de dilutions de l'extrait, en utilisant le véhicule d'extraction comme diluant.

Autrement, lorsqu'on soupçonne la présence de matériaux à solubilité limitée, il convient que les dilutions soient accomplies en variant le rapport d'extraction d'origine de l'échantillon d'essai sur le milieu d'extraction.

Si des monocouches sont utilisées pour l'essai, enlever et jeter le milieu de culture et ajouter une aliquote de l'extrait ou de sa dilution dans chacun des récipients.

Si l'essai est réalisé sur des cellules en suspension, ajouter l'extrait ou sa dilution dans chacun des récipients, immédiatement après préparation de la suspension cellulaire.

8.2.6 Lorsqu'un extrait non physiologique est utilisé, par exemple de l'eau, il doit être soumis à essai à la concentration la plus élevée physiologiquement compatible, après dilution dans le milieu de culture.

NOTE Un milieu de culture concentré, par exemple 2×, 5×, est recommandé pour diluer les extraits aqueux.

8.2.7 Ajouter des aliquotes connues du blanc et des contrôles positif et négatif dans des récipients supplémentaires.

NOTE Un contrôle constitué du milieu de culture frais peut aussi être soumis à essai, si nécessaire.

8.2.8 Placer les récipients en incubation à des conditions similaires à celles décrites en 8.2.3 pour une durée appropriée pour l'essai choisi.

8.2.9 Au terme d'une période d'incubation d'au moins 24 h, déterminer les effets cytotoxiques conformément à 8.5.

8.3 Essai par contact direct

8.3.1 Cet essai permet d'évaluer la cytotoxicité à la fois de façon qualitative et quantitative.

8.3.2 Dans la suspension cellulaire continuellement agitée, pipetter une aliquote connue et la transférer dans chacun des récipients en nombre suffisant pour réaliser l'exposition directe aux échantillons d'essai. Répartir uniformément les cellules à la surface de chaque récipient par une rotation horizontale douce.

8.3.3 Mettre la culture à incuber à $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dans de l'air supplémenté ou non de dioxyde de carbone, selon le système tampon sélectionné pour le milieu de culture, jusqu'à ce que les cellules aient atteint la sous-confluence.

8.3.4 Avant de commencer l'essai, vérifier la sous-confluence et la morphologie des cultures au microscope.

Dans des cas exceptionnels, il est permis d'ensemencer des cellules à croissance exponentielle (par exemple des cellules primaires, des cellules à forte prolifération) au départ de l'essai.

8.3.5 Retirer et jeter le milieu de culture. Puis, ajouter du milieu de culture frais dans chaque récipient.

8.3.6 Déposer délicatement les échantillons du matériau d'essai sur la couche de cellules, au centre de chaque récipient. Veiller que l'échantillon couvre approximativement un dixième de la surface de la couche cellulaire.

D'autres rapports de surface d'échantillon sur surface de couche cellulaire peuvent être utilisés s'ils sont justifiés.

Bien veiller à éviter tout mouvement inutile des échantillons, ce qui peut causer des traumatismes physiques aux cellules. Par exemple, des détachements de plaques de cellules peuvent résulter de mouvements inutiles.

NOTE Si nécessaire, l'échantillon peut être placé dans le récipient de culture avant l'ajout des cellules.

8.3.7 Préparer des récipients pour les matériaux de contrôle positif et négatif.