
**Qualité de l'eau — Évaluation de la
génétoxicité par le mesurage de
l'induction de micronoyaux —**

**Partie 1:
Évaluation de la génétoxicité à l'aide de
larves d'amphibiens**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Water quality — Evaluation of genotoxicity by measurement of the
induction of micronuclei —*

Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98cbf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006>



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 21427-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006>

© ISO 2006

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.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
5 Environnement de l'essai	3
6 Réactifs	3
7 Appareillage	4
8 Traitement et préparation des échantillons	4
8.1 Eaux, effluents, lixiviats et éluats étudiés	4
8.2 Substances étudiées	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Sélection des concentrations	5
9.2 Réalisation de l'essai	6
9.3 Interprétation des préparations histologiques	6
10 Expression des résultats	7
10.1 Présentation des résultats	7
10.2 Traitement des résultats	7
10.3 Interprétation des résultats	7
11 Validité de l'essai	7
12 Rapport d'essai	8
Annexe A (normative) Données spécifiques à <i>Pleurodeles waltl</i>	9
Annexe B (normative) Élevage	10
Annexe C (informative) Exemple de méthode statistique pour le traitement des résultats	11
Bibliographie	14

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 21427-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 21427 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux*:

- *Partie 1: Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens*
- *Partie 2: Méthode de la population mélangée à l'aide de la lignée de cellules V79*

Introduction

La protection de l'environnement exige de prendre en considération les dangers génotoxiques susceptibles de toucher les différentes populations qui constituent les écosystèmes. Étant donné que ces dangers peuvent concerner l'eau, il est indispensable de les apprécier au moyen d'essais en laboratoire permettant d'évaluer, dans les milieux aqueux, la génotoxicité d'une eau, d'un effluent, d'une substance ou d'une préparation vis-à-vis des organismes vivant en milieu aquatique.

La présente partie de l'ISO 21427 décrit une méthode d'essai susceptible de fournir des informations dans ce domaine. Elle permet de mettre en évidence, dans les milieux aquatiques, les effets génotoxiques sur les larves de deux espèces d'amphibiens vivant en milieu aquatique, *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl*.

Il est recommandé de choisir *Xenopus* du fait des différents avantages que présente cette espèce (taux d'éclosion élevé, disponibilité tout au long de l'année après un traitement hormonal des reproducteurs, développement larvaire rapide, alimentation facile des larves, distribution étendue dans les centres de recherche ou d'élevage). Cependant, la méthode décrite s'applique aussi aux larves de Pleurodèles. Les dispositions spécifiques à cet organisme sont données dans l'Annexe A.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21427-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21427-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-c0e74bc85a95/iso-21427-1-2006>

Qualité de l'eau — Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux —

Partie 1: Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 21427 connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de mettre en place des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais menés selon la présente partie de l'ISO 21427 soient réalisés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 21427 spécifie une méthode pour évaluer la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens (*Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl*). Les dispositions spécifiques aux Pleurodèles sont données dans l'Annexe A.

La méthode décrite s'applique:

- aux effluents aqueux,
- aux lixiviats aqueux,
- aux éluats de sols,
- aux éluats de déchets industriels,
- aux éluats de boues de traitement des eaux usées,
- aux eaux de surface ou souterraines,
- aux substances solubles dans l'eau et miscibles à l'eau.

2 Références normatives

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 5667-16, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 7346-1, *Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Partie 1: Méthode statique*

ISO 7346-2, *Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Partie 2: Méthode semi-statique*

ISO 7346-3, *Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Partie 3: Méthode avec renouvellement continu*

EN 12457-2, *Caractérisation des déchets — Lixiviation — Essai de conformité pour la lixiviation des déchets fragmentés et des boues — Partie 2: Essai en bûchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité)*

NF T 90-305, *Essais des eaux — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de Salmo gairdneri — Méthodes sans renouvellement et avec renouvellement continu du milieu*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 micronoyaux

petites particules formées de fragments acentriques de chromosomes et/ou de chromosomes entiers, qui ne migrent pas au cours de l'anaphase de la division cellulaire et qui, après la télophase, forment un ou plusieurs micronoyaux dans le cytoplasme

3.2 échantillon étudié

substance, effluent, eau de surface, eau souterraine, effluent aqueux, lixiviat, eau de percolation ou éluat soumis à l'essai

3.3 milieu d'essai

mélange constitué par l'eau d'essai (6.2), l'échantillon étudié et les aliments

3.4 solution d'essai

mélange constitué par l'eau d'essai (6.2) et l'échantillon étudié

4 Principe

Les organismes d'essai sont exposés pendant 12 j^[3] à une plage de concentrations de l'échantillon étudié. Un essai témoin sans échantillon (témoin négatif) et un essai témoin avec une substance génotoxique de référence (témoin positif) sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions. Le témoin positif permet de vérifier la qualité du réactif biologique et de valider l'essai.

Au cours de la division cellulaire, des fragments de chromatides dépourvus de centromère ne se déplacent pas vers les noyaux des cellules filles et restent dans le cytoplasme. Certaines aberrations chromosomiques induites par l'élément d'essai consiste en des fragments de chromatides dépourvus de centromère et qui ne sont donc pas incorporés dans les noyaux des cellules filles. De plus, des anomalies du fuseau peuvent générer des chromosomes qui ne sont pas incorporés dans le noyau. Ce ne sont pas des noyaux et ils se forment dans le cytoplasme de la cellule, pas dans le plasma. Le taux (pour mille ‰) d'érythrocytes présentant des micronoyaux est déterminé pour chaque concentration de l'échantillon étudié et pour les solutions témoins. Le taux d'érythrocytes présentant des micronoyaux est comparé, pour chaque concentration, à celui du témoin négatif afin de déterminer les concentrations qui induisent un effet génotoxique positif.

NOTE Le taux d'érythrocytes avec micronoyaux se définit par le niveau d'érythrocytes comportant un ou plus d'un micronoyau comptabilisé dans un échantillon de 1 000 érythrocytes observés dans un frottis sanguin.

5 Environnement de l'essai

Tous les essais ainsi que les manipulations, l'élevage des adultes et des larves, doivent être réalisés dans une pièce dont l'atmosphère est dépourvue de poussières et de vapeurs toxiques.

L'essai est réalisé sous éclairage (lumière artificielle ou lumière naturelle à l'abri des rayons du soleil) selon un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité, dans une chambre thermostatée (7.3) de manière à conserver les bouteilles à une température de $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6 Réactifs

6.1 Réactif biologique, *Xenopus laevis* ¹⁾ désigné ci-après par le nom commun Xenopus.

Les essais doivent débuter sur des larves au stade 50 de la table chronologique de développement de Nieuwkoop et Faber ^[1]. À ce stade, les animaux mesurent de 20 mm à 27 mm de long et présentent un étranglement à la base de la patte postérieure.

Les larves doivent être conservées dans des récipients (7.2) pendant au moins 8 j avant le début de l'essai, dans des conditions de température et d'éclairage identiques à celles de l'essai. Les larves ne doivent pas présenter de maladies ni de malformations.

Pour un essai donné, les lots de larves traitées et les larves témoins doivent provenir de la même éclosion. Chaque lot comporte au moins 15 récipients d'essai (7.2).

6.2 Eau d'essai.

L'eau utilisée pour l'essai doit satisfaire aux critères définis dans le premier paragraphe de l'Annexe B. Dans l'éventualité où l'eau d'essai est différente de l'eau d'élevage, les organismes doivent être maintenus dans l'eau d'essai pendant 8 j au moins avant de démarrer l'essai.

6.3 Aliments.

Les aliments utilisés sont ceux généralement prévus pour les poissons d'aquarium ²⁾. Ils doivent être réduits en poudre juste avant utilisation. De la poudre de cresson lyophilisé peut aussi être utilisée.

6.4 Substance de référence, cyclophosphamide monohydraté ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}, \text{H}_2\text{O}$) de qualité analytique reconnue, à une concentration de 20 mg/l.

6.5 Solvant intermédiaire, diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou tout autre solvant miscible à l'eau adéquat.

La génotoxicité ou tout autre effet toxique du solvant utilisé doivent être établis au préalable.

6.6 Anesthésique, tricaïne méthane sulfonate.

6.7 Héparine, solution de 200 µg/l d'héparine en poudre dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 7 g/l.

6.8 Méthanol, CH_3OH , de qualité analytique reconnue.

1) *Xenopus* peut être obtenu auprès du Service d'élevage de Xénopes du C.N.R.S., UPRES A 6026 C.N.R.S., Université de Rennes I, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.

2) «Tetraphyll» est un exemple de produit adapté disponible dans le commerce.

Ces informations sont données à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifient nullement l'approbation de ces produits par l'ISO.

6.9 Colorants ^[16]

6.9.1 Hémalun de Masson.

Composition

Hématine	2 mg/ml
Alun de potassium (sulfate double d'aluminium et de potassium)	10 %

6.9.2 Hématoxyline de Groat.

Composition

Alun de fer et d'ammonium [sulfate de fer(III) et d'ammonium]	1,0 g
Hématoxyline	0,5 g
Acide sulfurique concentré	0,8 ml
Éthanol	50 ml
Eau	50 ml

7 Appareillage

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Matériel courant de laboratoire, en verre ou en matériau chimiquement inerte et, en particulier, ce qui suit.

7.1 **Aquariums**, capacité de 25 l ou de 50 l. [ISO 21427-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-0b14c85a856c/iso-21427-1-2006)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/98ebf7de-4b79-401e-ac3f-0b14c85a856c/iso-21427-1-2006)

7.2 **Récipients en verre**, par exemple bouteilles, capacité de 5 l, pouvant être fermés hermétiquement.

Des fioles coniques avec des bouchons en verre rodé ou en caoutchouc revêtues d'un film en tétrafluorocarbène conviennent.

7.3 **Chambre thermostatée**, de capacité suffisante pour contenir toutes les bouteilles correspondant aux différents lots d'un essai complet (échantillon d'essai, substance de référence et témoin négatif) et permettant de conserver les bouteilles (7.2) à une température de 22 °C ± 1 °C.

7.4 **Loupe binoculaire**.

7.5 **Microscope**, équipé d'un objectif à immersion (grossissement total × 1 500).

7.6 **Micropipettes héparinisées**.

NOTE Pour hépariniser les micropipettes, elles sont déployées et ouvertes, puis la partie pointue est remplie d'une solution de 200 µg/ml d'héparine mélangés à une solution de 7 g/l de NaCl.

8 Traitement et préparation des échantillons

8.1 Eaux, effluents, lixiviats et éluats étudiés

Il est recommandé d'échantillonner, transporter et conserver les échantillons selon les modes opératoires généraux décrits dans l'ISO 5667-16.

Le laps de temps entre la collecte de l'échantillon et sa réception au laboratoire ne doit pas dépasser 24 h.

Dans le cas d'échantillons solides (déchets, sols, boues), réaliser un essai de lixiviation selon le protocole décrit dans l'EN 12457-2 dans le mois suivant la réception de l'échantillon par le laboratoire. Toutefois, les éluats aqueux obtenus ne doivent pas être filtrés avant l'essai. Les éluats obtenus doivent être gardés à l'obscurité à une température de $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ jusqu'à ce que l'essai soit effectué. Celui-ci doit débuter au plus tard 24 h après l'étape de lixiviation.

Les échantillons d'eaux, d'effluents ou de lixiviats contenus dans les bouteilles en matériaux chimiquement inertes doivent être conservés à l'obscurité, à une température de $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ jusqu'à ce que l'essai soit effectué. Celui-ci doit être réalisé au plus tard 24 h après la réception de l'échantillon par le laboratoire.

Au moment de l'essai, homogénéiser l'échantillon à analyser. Les quantités d'échantillon (3.2) requises pour le renouvellement quotidien du milieu d'essai (3.3) sont au préalable amenées à la température de $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Si le pH de l'échantillon ne se trouve pas dans la plage de 6 à 8 (compris), l'ajuster à 7 ± 1 à l'aide d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium et homogénéiser l'échantillon étudié (3.2).

8.2 Substances étudiées

8.2.1 Préparation des solutions mères des substances étudiées

La solution mère de la substance étudiée est préparée en dissolvant une quantité connue de la substance dans un volume spécifié d'eau d'essai (6.2). Elle doit être préparée au moment de l'emploi. Cependant, si la solution mère de la substance est stable à l'obscurité et à 4 °C , elle peut être préparée à l'avance et conservée dans ces conditions.

8.2.2 Préparation des solutions d'essai des substances étudiées

Les solutions d'essai sont préparées juste avant l'emploi en diluant la solution mère dans l'eau d'essai (6.2) afin d'obtenir les concentrations nécessaires.

Dans le cas de substances peu solubles ou insolubles dans l'eau, un solvant intermédiaire miscible à l'eau (6.5) peut être utilisé. Dans ce cas, la concentration de solvant doit être la même dans chaque récipient et ne doit pas dépasser 100 mg/l. L'eau d'essai (6.2) est agitée au moment de l'introduction de la solution intermédiaire, ce qui entraîne généralement la formation d'une microsuspension. S'il se forme un précipité, l'essai ne peut pas être réalisé. S'il n'est pas possible de contourner l'utilisation d'un solvant intermédiaire, un lot témoin négatif contenant le même solvant doit être inclus dans l'essai.

9 Mode opératoire

9.1 Sélection des concentrations

L'essai doit comprendre au moins cinq concentrations de l'échantillon étudié avec un pas de raison géométrique inférieure ou égale à deux entre chaque concentration. Ces concentrations constituent les solutions d'essai (3.4).

Pour les substances, les concentrations sont, par exemple:

10 mg/l; 5 mg/l; 2,5 mg/l; 1,25 mg/l; 0,62 mg/l; 0,31 mg/l.

Pour les échantillons d'eaux, d'effluents, de lixiviats ou d'éluats, les concentrations sont, par exemple:

1 000 ml/l; 500 ml/l; 250 ml/l; 125 ml/l; 62,5 ml/l.

Cette plage de concentrations est préparée en diluant l'échantillon avec l'eau d'essai (6.2).

Chaque essai doit inclure un lot témoin négatif sans l'échantillon étudié.