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

**Partie 2:
Méthode de la population mélangée à
l'aide de la lignée de cellules V79**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Water quality — Evaluation of genotoxicity by measurement of the
induction of micronuclei —*

Part 2: Mixed population method using the cell line V79

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-1831a64ab228/iso-21427-2-2006>



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 21427-2:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-1831a64ab228/iso-21427-2-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-1831a64ab228/iso-21427-2-2006>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© 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

Version française parue en 2009

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	3
5 Interférences	3
6 Réactifs et milieux	3
7 Appareillage	7
8 Critères relatifs à l'installation d'essai	8
9 Mode opératoire	8
10 Évaluation et estimation	12
11 Fidélité	14
12 Rapport d'essai	14
Annexe A (informative) Méthode à la bromodésoxyuridine (BrdU)	16
Annexe B (informative) Schémas d'évaluation	18
Annexe C (normative) Fraction S9	19
Annexe D (informative) Données de fidélité	20
Bibliographie	21

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 21427-2 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*

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

Partie 2:

Méthode de la population mélangée à l'aide de la lignée de cellules V79

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 21427 connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente norme n'a pas pour objectif de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. L'utilisateur est tenu d'établir des pratiques de sécurité et d'hygiène appropriées et de s'assurer de leur conformité aux réglementations nationales existantes.

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

iTeh STANDARD PREVIEW

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

La présente partie de l'ISO 21427 spécifie une méthode permettant de déterminer la génotoxicité de l'eau et des eaux usées par un essai réalisé *in vitro* sur des mammifères pour détecter les dommages induits par les substances hydrosolubles sur les chromosomes ou l'appareil mitotique des cellules V79 du hamster chinois.

L'essai du micronoyau permet d'identifier les substances provoquant des dommages cytogénétiques à l'origine de la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosome retardataires et/ou des chromosomes entiers retardataires.

L'analyse est basée sur l'augmentation de la fréquence des cellules micronucléées après une incubation avec et sans activation métabolique.

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*

3 Termes et définitions

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

3.1

lignées cellulaires

familles distinctes de cellules cultivées provenant d'un seul clone

3.2

solution de cofacteurs

solution aqueuse de produits chimiques (par exemple NADP, glucose-6-phosphate et sels inorganiques) nécessaires à l'activité des enzymes de la fraction S9

3.3

degré de dilution D

dénominateur du coefficient de dilution (en utilisant le numérateur 1) d'un mélange d'eau ou d'eaux usées et d'eau de dilution, sous forme d'un nombre entier

NOTE Lorsque l'eau ou les eaux usées ne sont pas diluées, ce coefficient est par définition 1:1. La plus faible valeur D correspondante possible est 1.

3.4

valeur D

plus faible valeur de D à laquelle, dans les conditions définies dans la présente partie de l'ISO 21427, aucune augmentation du nombre de micronoyaux par culture n'est observée

NOTE En présence de plus d'une valeur D (deux sont possibles au maximum, voir 9.2), la valeur D la plus élevée est déterminante.

3.5

caryotype

caractéristique du noyau d'une cellule, définie par la taille, la forme et le nombre de chromosomes

3.6

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

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 21427-2:2006

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-1831a64ab228/iso-21427-2-2006)

[1831a64ab228/iso-21427-2-2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-1831a64ab228/iso-21427-2-2006)

3.7

index mitotique

pourcentage de cellules en division dans une population de cellules à un moment d'observation particulier

3.8

efficacité d'ensemencement

mesure du nombre de colonies issues de cellules uniques

3.9

index de prolifération

vitesse à laquelle les cellules se divisent dans la culture

3.10

vitesse de prolifération

vitesse à laquelle les cellules se répliquent, calculée par une formule tenant compte des stades 1, 2, 4 et 8 cellules des clones

3.11

fraction S9

9 000 g de surnageant d'un homogénat tissulaire dans 0,15 mol/l de KCl, obtenu à partir de foies de rats mâles (200 g à 300 g) prétraités par une substance ou une combinaison de substances appropriée pour l'induction enzymatique

3.12

mélange S9

mélange de la fraction S9 et de la solution de cofacteurs

3.13**culture souche**

culture congelée afin de conserver les caractéristiques des cellules V79

3.14**index de survie**

pourcentage de cellules survivantes par rapport au nombre total de cellules, utilisé comme indice de toxicité

3.15**culture d'essai**

culture cellulaire utilisée pour l'étude

4 Principe

L'éventuelle activité clastogène et/ou aneugène de l'échantillon pour essai est détectée en comparant, pour la condition d'activation respective, le nombre de cellules micronucléées dans des cultures traitées par le témoin négatif et leur nombre dans des cultures traitées respectivement par des échantillons pour essai non dilués et dilués.

Au cours de la division cellulaire, les fragments de chromatides dépourvus de centromère ne se déplaceront pas vers les noyaux des cellules filles et resteront dans le cytoplasme. Certaines aberrations chromosomiques induites par l'élément d'essai consistent en des fragments de chromatides dépourvus de centromère qui ne seront 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. Ces particules formeront des micronoyaux dans le plasma.

Les cellules V79 sont exposées pendant 24 h (4 h avec le mélange S9) à une gamme de concentrations d'un échantillon pour essai. Des lames sont ensuite préparées, les cellules sont colorées et la présence de cellules micronucléées est évaluée. Une incidence accrue de ces cellules micronucléées par rapport au témoin négatif indique que l'élément d'essai peut provoquer une fragmentation des chromosomes ou des anomalies du fuseau dans les cellules V79 *in vitro*.

5 Interférences

Des modifications biologiquement pertinentes des conditions de culture peuvent induire une aberration chromosomique due à des mécanismes secondaires donnant un positif artificiel et donc des résultats non pertinents [16]. Ces facteurs sont, par exemple, des variations plus importantes de l'osmolalité ou du pH, la précipitation de l'échantillon pour essai et sa phagocytose, et des effets cytotoxiques importants de l'échantillon pour essai. Par conséquent, il convient de surveiller les échantillons pour essai, au moins en ce qui concerne les variations du pH ou de l'osmolalité des cultures, en utilisant la même proportion d'élément d'essai par culture que celle qui sera utilisée ultérieurement dans les conditions d'essai. En cas de variation du pH de la culture, il convient de régler le pH de l'élément d'essai à $7,0 \pm 0,2$. En cas de variation de l'osmolalité, la plus forte concentration utilisée lors de l'essai doit être réduite afin d'éviter toute variation correspondante de l'osmolalité dans les cultures. Pour éviter les artéfacts dus à la phagocytose ou à une cytotoxicité sévère, il convient de respecter les limites indiquées pour la concentration la plus élevée lors des essais (voir 9.1 et 9.2).

6 Réactifs et milieux

Dans la mesure du possible, utiliser des produits chimiques de «qualité réactif».

Si des produits chimiques ayant différentes teneurs en eau de cristallisation sont utilisés, calculer les quantités requises en conséquence.

Toujours effectuer le passage à l'autoclave pendant 20 min à $121 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Recouvrir les récipients sans serrage (par exemple à l'aide d'une feuille d'aluminium). Ne jamais les fermer de manière étanche.

6.1 Eau.

Préparer toutes les solutions aqueuses avec de l'eau ayant une conductivité inférieure ou égale à 5 µS/cm.

6.2 Réactifs.

6.2.1 Glucose-6-phosphate dihydraté, $C_6H_{11}O_9PNa_2, 2H_2O$.

6.2.2 Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate, sel disodique, NADP, $C_{21}H_{26}N_7Na_2O_{17}P_3$.

6.2.3 Chlorure de magnésium hexahydraté, $MgCl_2, 6H_2O$.

6.2.4 Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 .

6.2.5 Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $Na_2HPO_4, 2H_2O$.

6.2.6 Éthanol (absolu), C_2H_5OH .

6.2.7 Acide acétique glacial, CH_3COOH .

6.2.8 Formaldéhyde, HCHO, 37 % en fraction volumique.

6.2.9 Citrate trisodique dihydraté, $HOC(COONa)(CH_2COONa)_2, 2H_2O$.

6.2.10 Hydrogénophosphate disodique, Na_2HPO_4 .

6.2.11 Dihydrogénophosphate de sodium, NaH_2PO_4 .

6.2.12 Solution de May-Grünwald, modifiée¹⁾.

6.2.13 Acide chlorhydrique, $c(HCl) = 1 \text{ mol/l}$. [ISO 21427-2:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-427-2-2006)

6.2.14 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(NaOH) = 23 \text{ mol/l}$. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/681d195b-f98b-4b16-9abf-427-2-2006>

6.2.15 Diméthylsulfoxyde (DMSO), C_2H_6SO .

6.2.16 Témoins positifs.

6.2.16.1 Cyclophosphamide, monohydraté, $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P, H_2O$.

Numéro CAS: 6055-19-2.

6.2.16.2 Sulfonate d'éthylméthane (EMS), $CH_3SO_3CH_2CH_3$.

Numéro CAS: 62-50-0.

6.2.17 Solution de citrate de sodium pour traitement hypotonique.

Préparer une solution aqueuse à 1,5 % de citrate trisodique.

6.2.18 Solution de fixation.

Mélanger 50 ml d'acide acétique glacial avec 150 ml d'éthanol, ajouter 2,5 ml d'une solution de formaldéhyde à 37 %.

1) Ce réactif est disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 21427 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

6.2.19 Solution tampon selon WEISE (pH 7,2)¹⁾.

Cette solution est commercialisée en ampoules. Diluer le contenu d'une ampoule dans de l'eau et, à l'aide d'une fiole jaugée de 1 000 ml, compléter avec de l'eau.

6.2.20 Solution de Giemsa¹⁾.

Préparer une solution de Giemsa à 2,6 % dans la solution tampon selon WEISE (pH 7,2) (6.2.19). Filtrer avant utilisation.

6.2.21 Tampon phosphate.

Dissoudre 2,13 g de Na_2HPO_4 dans 1 l d'eau. Dissoudre 1,8 g de NaH_2PO_4 dans 1 l d'eau. Mélanger ces deux solutions dans un rapport de 4:1 et ajuster le pH final à 7,4.

6.2.22 Milieu MEM (= Milieu Essentiel Minimum) avec glutamine stabilisée¹⁾.**6.2.23 Sérum fœtal de veau (= FCS)¹⁾.****6.2.24 Solution de pénicilline/streptomycine, 10 000 E/10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹⁾.****6.2.25 Solution d'amphotéricine B, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹⁾.****6.2.26 Solution de trypsine/EDTA, 0,25 %¹⁾.****6.2.27 Solution saline équilibrée de Hanks (= HBSS)¹⁾.****6.2.28 Solution saline équilibrée de Hanks (= HBSS) sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} ¹⁾.****6.2.29 Solution de chlorure de potassium.**

Dissoudre 4 g de chlorure de potassium dans 1 l d'eau.

6.3 Préparation des milieux de culture.**6.3.1 Milieu de culture avec FCS.**

Ce milieu est utilisé comme milieu de culture général et pour le traitement des cellules sans le mélange S9.

Mélanger 500 ml du milieu MEM, 50 ml de FCS, 5 ml de la solution de pénicilline/streptomycine et 5 ml de la solution d'amphotéricine B.

Le milieu est stable pendant 4 semaines s'il est conservé au réfrigérateur à $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

6.3.2 Milieu de culture sans FCS.

Ce milieu n'est utilisé que pendant la période de traitement des cellules en condition d'activation (mélange S9).

Mélanger 500 ml du milieu MEM, 5 ml de la solution de pénicilline/streptomycine et 5 ml de la solution d'amphotéricine B.

Le milieu est stable pendant 4 semaines s'il est conservé au réfrigérateur à $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

6.4 Système cellulaire.

6.4.1 Lignée cellulaire, conservation

La lignée cellulaire V79 est une lignée cellulaire permanente de cellules de poumon de hamster chinois ayant

- une vitesse de prolifération élevée (durée du cycle cellulaire de l'ordre de 12 h à 16 h);
- une efficacité d'ensemencement élevée (≥ 90 %);
- un caryotype stable (nombre modal de chromosomes = 22).

Conserver les cultures permanentes (échantillons de 1 ml contenant 7 % de DMSO) dans de l'azote liquide à environ -196 °C. Avant la congélation, vérifier chaque lot afin de détecter une éventuelle contamination par les mycoplasmes. Il convient de déterminer le caryotype et l'efficacité d'ensemencement (aptitude à former des colonies) au moins avant la première utilisation d'une culture décongelée.

6.4.2 Culture

Pour commencer une culture, décongeler une culture permanente dans un bain-marie à 37 °C et introduire 0,5 ml de cet échantillon dans un flacon de culture de 25 cm² contenant déjà environ 5 ml de MEM (milieu essentiel minimum, constitué d'un milieu, de glutamine et d'antibiotiques), y compris 10 % de FCS (sérum foetal de veau). Cultiver les cellules à 37 °C, en utilisant 5 % de dioxyde de carbone et une humidité d'au moins 90 %. Repiquer les cellules deux fois par semaine.

Retirer les flacons (25 cm²) de l'incubateur et les placer sur une paillasse propre. Ouvrir les flacons un à un et éliminer le milieu par aspiration. Laver les cellules une fois à l'aide de 5 ml de la solution saline équilibrée de Hanks (HBBS, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) pendant environ 5 min. Procéder ensuite à une nouvelle élimination du milieu.

Trypsiniser les cellules pendant environ 5 min à l'aide de 1,0 ml environ de trypsine (0,25 %) et 1,0 ml environ de HBBS (sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) afin de décoller les cellules du fond du flacon de culture.

Stopper cette réaction en ajoutant environ 3 ml de MEM contenant 10 % de FCS.

Pipetter ce mélange plusieurs fois afin de décoller les cellules du flacon et d'obtenir une suspension homogène de cellules isolées.

Compter les cellules dans un échantillon de 10 μ l à l'aide d'un hémocytomètre²⁾.

Diluer la suspension jusqu'à la densité cellulaire requise (30 000 à 80 000 par culture) en utilisant un milieu MEM contenant 10 % de FCS.

6.4.3 Durée du cycle cellulaire

La durée du cycle cellulaire des cellules V79 est normalement de 12 h à 16 h environ. Déterminer leur durée de vie spécifique en laboratoire par la méthode à la BrdU³⁾ (voir Annexe A).

2) Il est également possible d'utiliser un compteur automatique de cellules ou de particules.

3) BrdU signifie bromodésoxyuridine.

6.5 Activation métabolique

6.5.1 Fraction S9

Pour le traitement d'induction enzymatique et la préparation de la fraction S9, voir l'Annexe C. Si la fraction S9 est achetée dans le commerce, elle doit avoir été préparée (y compris l'induction enzymatique) conformément à l'Annexe C.

6.5.2 Mélange S9

Préparer la quantité nécessaire de fraction S9 le jour même de l'essai ou, si elle congelée, décongeler à température ambiante. Immédiatement après, préparer le mélange S9 en mélangeant les composés suivants dans des conditions stériles:

- a) 1 aliquote de fraction S9;
- b) 9 aliquotes de supplément S9 (solution de cofacteurs).

Conserver le mélange S9 en permanence sur de la glace (par exemple dans une ampoule à décanter à double paroi contenant de l'eau glacée entre les deux parois) et l'utiliser uniquement le jour même. À la fin de la journée, jeter le mélange S9 restant. Les concentrations de cofacteurs dans le mélange S9 sont les suivantes:

MgCl ₂	8 mmol/l
KCl	33 mmol/l
Glucose-6-phosphate	5 mmol/l
NADP	4 mmol/l
Tampon phosphate (pH 7,4)	15 mmol/l

7 Appareillage

- 7.1 **Fioles cryogéniques**, 1 ml, 2 ml, 5 ml.
- 7.2 **Flacons de culture cellulaire**, 25 cm², 75 cm².
- 7.3 **Boîtes de Petri**, adaptées à 4 lames pour microscope, d'environ 9 cm × 13 cm.
- 7.4 **Lames pour microscope avec partie givrée (dépolie)**.
- 7.5 **Incubateur à CO₂**.
- 7.6 **Poste de travail à flux d'air laminaire**.
- 7.7 **Bain-marie**.
- 7.8 **Pompe à vide**.
- 7.9 **Microscope inversé**.
- 7.10 **Microscope optique**.
- 7.11 **Bec Bunsen**.