

---

---

**Radioprotection — Critères de performance pour les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique par le test des micronoyaux avec blocage de la cytodivision (CBMN) dans les lymphocytes du sang périphérique**

*Radiological protection — Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry*

*(https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014)*

**Document Preview**

ISO 17099:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014>



iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO 17099:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2014

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Méthodologie du test des micronoyaux</b> .....	<b>4</b>
3.1 Généralités.....	4
3.2 Exigences générales relatives au laboratoire.....	4
3.3 Demandes d'analyse et prélèvement de sang.....	4
3.4 Culture des cellules.....	5
3.5 Coloration.....	6
3.6 Microscopie.....	6
3.7 Dénombrement visuel des lames.....	6
3.7.1 Généralités.....	6
3.7.2 Critères de dénombrement.....	6
3.7.3 Tableaux de dénombrement.....	7
3.8 Analyse automatisée.....	7
<b>4</b> <b>Confidentialité des informations personnelles</b> .....	<b>7</b>
4.1 Généralités.....	7
4.2 Applications du principe de confidentialité.....	8
4.2.1 Délégation de responsabilités au sein du laboratoire.....	8
4.2.2 Demandes d'analyse.....	8
4.2.3 Transmission d'informations confidentielles.....	8
4.2.4 Anonymat des échantillons.....	8
4.2.5 Présentation des résultats.....	8
4.2.6 Stockage.....	8
<b>5</b> <b>Exigences de sécurité du laboratoire</b> .....	<b>9</b>
5.1 Généralités.....	9
5.2 Exigences de sécurité microbiologique.....	9
5.3 Exigences de sécurité chimique.....	9
5.4 Exigences de sécurité optique.....	11
5.5 Procédures de sécurité.....	11
<b>6</b> <b>Source(s) d'étalonnage, courbe de calibration et dose minimum détectable</b> .....	<b>11</b>
6.1 Source(s) d'étalonnage.....	11
6.2 Courbe de calibration.....	11
6.3 Fréquence de base des micronoyaux.....	12
6.4 Mesure de la dose minimum détectable.....	13
<b>7</b> <b>Responsabilité du demandeur</b> .....	<b>13</b>
<b>8</b> <b>Responsabilité du laboratoire d'analyse</b> .....	<b>13</b>
8.1 Mise en place et maintenance d'un programme d'assurance de la qualité (AQ).....	13
8.2 Responsabilité pendant le service.....	14
<b>9</b> <b>Surexposition accidentelle d'un petit nombre d'individus</b> .....	<b>15</b>
9.1 Procédure de dénombrement des micronoyaux dans les cellules binucléées.....	15
9.1.1 Codage des échantillons et des lames.....	15
9.1.2 Techniques de dénombrement.....	15
9.1.3 Compétence du laboratoire pour le dénombrement.....	15
9.2 Critères pour convertir un taux de micronoyaux en une estimation de dose absorbée.....	15
9.2.1 Généralités.....	15
9.2.2 Comparaison avec les valeurs témoins.....	16
9.2.3 Détermination de la dose estimée et des limites de l'intervalle de confiance.....	16
9.2.4 Cas d'exposition aiguë et non aiguë.....	16
9.2.5 Analyse de la répartition des micronoyaux par cellule binucléée.....	16

9.3	Présentation des résultats .....	17
9.3.1	Généralités .....	17
9.3.2	Contenu du rapport (voir <a href="#">Annexe E</a> pour un format normalisé) .....	17
9.3.3	Interprétation des résultats .....	18
<b>10</b>	<b>Tri de population .....</b>	<b>18</b>
10.1	Généralités .....	18
10.2	Utilisation d'un réseau employant le test des CBMN pour les expositions de grande ampleur .....	18
10.3	Procédure de dénombrement des micronoyaux dans les cellules binucléées .....	18
10.4	Critères pour convertir un taux de micronoyaux en une estimation de dose absorbée .....	19
10.5	Présentation des résultats .....	19
<b>11</b>	<b>Assurance et contrôle de la qualité .....</b>	<b>19</b>
11.1	Généralités .....	19
11.2	Assurance de la qualité .....	19
11.2.1	Plan d'assurance de la qualité .....	19
11.2.2	Personne ou organisation en charge de l'assurance de la qualité .....	19
11.3	Contrôle de la qualité .....	19
11.3.1	Généralités .....	19
11.3.2	Procédures de contrôle de la qualité .....	19
11.3.3	Contrôle de performance du transport des prélèvements .....	20
11.3.4	Contrôle de performance de l'intégrité des prélèvements par le laboratoire d'analyse .....	20
11.3.5	Contrôle de performance de l'appareillage .....	20
11.3.6	Contrôle de performance des protocoles expérimentaux .....	20
11.3.7	Contrôle de performance de la qualité de dénombrement .....	21
11.3.8	Contrôle de performance de l'estimation de la dose et de l'intervalle de confiance .....	21
11.3.9	Contrôle de performance du rapport d'expertise .....	21
<b>Annexe A</b> (informative)	<b>Tableau type pour le dénombrement des micronoyaux dans les cellules binucléées .....</b>	<b>22</b>
<b>Annexe B</b> (informative)	<b>Automatisation du dénombrement des micronoyaux .....</b>	<b>23</b>
<b>Annexe C</b> (informative)	<b>Instructions pour le demandeur (exemple) .....</b>	<b>25</b>
<b>Annexe D</b> (informative)	<b>Exemple de questionnaire .....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe E</b> (informative)	<b>Exemple de rapport portant sur une évaluation individuelle .....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe F</b> (informative)	<b>Exemple de rapport portant sur un groupe d'individus .....</b>	<b>29</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>31</b>	

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 85, *Énergie nucléaire, sous-comité SC 2, Radioprotection*.

[ISO 17099:2014](https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014)

<https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014>

## Introduction

L'objectif de la présente Norme internationale est de définir l'utilisation de la dosimétrie biologique par le test des micronoyaux avec blocage de la cytodièrese (CBMN) dans les lymphocytes du sang périphérique humain qui ont été exposés à des rayonnements ionisants. Ce test est destiné à être appliqué en cas d'exposition accidentelle ou malveillante impliquant a) un nombre de personnes réduit afin de fournir des estimations de doses complètes et individuelles, ou b) dans une situation de tri d'urgence afin de fournir des estimations de doses provisoires pour les individus d'une population.

Le test des CBMN est une autre technique cytogénétique qui est plus simple et éventuellement plus rapide à mettre en œuvre que le dénombrement des dicentriques (ISO 19238:2014, ISO 21243:2008). Il est également couramment employé pour démontrer l'exposition aux agents génotoxiques autres que les rayonnements ionisants, qui ne sont pas couverts par la présente Norme internationale. Bien que la période de culture des échantillons de sang soit légèrement plus longue que pour les dicentriques, le dénombrement des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés est plus aisé.

Comme pour le dénombrement des dicentriques, le test des CBMN a été adapté pour le tri en urgence en cas d'accident d'irradiation impliquant de très nombreuses personnes. Le volume de sang requis pour disposer d'un nombre suffisant de cellules binucléées dénombrables est similaire à celui requis pour le dénombrement des dicentriques. Une fois encore, la rapidité de comptage des micronoyaux compense l'allongement de la période de culture. De plus, le test des CBMN peut être automatisé.

La présente Norme internationale fournit des lignes directrices pour l'évaluation dosimétrique en utilisant des procédures de test des CBMN documentées et validées. L'évaluation de dose en utilisant le test des CBMN est pertinente pour la prise en charge médicale, la radioprotection, l'enregistrement et les exigences médico-légales. La présente Norme internationale est scindée en deux parties, selon l'utilisation du test des CBMN: exposition aux rayonnements d'un petit nombre d'individus ou tri d'une population en cas d'événement radiologique de grande ampleur.

Une partie de l'information contenue dans la présente Norme internationale est incluse dans d'autres guides et publications scientifiques internationales, et principalement dans le document sur la Dosimétrie Biologique dans la Série de Rapports Techniques de l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA). Cependant, la présente Norme internationale développe et normalise l'assurance et le contrôle de la qualité, les critères d'accréditation et l'évaluation des performances. De manière générale, la présente Norme internationale se conforme à l'ISO/IEC 17025, «*Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*» en portant une attention particulière aux besoins spécifiques de la dosimétrie biologique. L'expression des incertitudes dans les estimations de dose indiquées dans la présente Norme internationale est en accord avec le Guide ISO pour l'expression de l'incertitude de mesure (ancien GUM) et toutes les parties de la norme ISO 5725.

# Radioprotection — Critères de performance pour les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique par le test des micronoyaux avec blocage de la cytodièrese (CBMN) dans les lymphocytes du sang périphérique

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale porte sur:

- a) la confidentialité des informations personnelles pour le demandeur et le laboratoire;
- b) les exigences de sécurité du laboratoire;
- c) les sources de rayonnements, les débits de doses et les gammes utilisées pour établir les courbes dose-effet d'étalonnage de référence qui permettent d'estimer les doses à partir des résultats du test des CBMN, ainsi que la dose minimum détectable;
- d) le prélèvement de sang, la mise en culture, le recueil des cellules après culture et la préparation des échantillons pour le test des CBMN;
- e) les critères de dénombrement;
- f) la conversion de la fréquence des micronoyaux dans les cellules binucléées en estimation de dose absorbée;
- g) la présentation des résultats;
- h) l'assurance et le contrôle de la qualité;
- i) les annexes informatives contenant des exemples de questionnaire, d'instructions d'utilisation, de tableau de dénombrement au microscope et de rapport, ainsi qu'une synthèse des avantages et limites des systèmes automatisés actuellement disponibles pour le dénombrement des micronoyaux.

## 2 Termes et définitions

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

### 2.1

#### **acentrique**

fragment chromosomique de taille variable

Note 1 à l'article: lorsqu'il est formé indépendamment d'une aberration chromosomique de type dicentrique ou anneau centrique, il est habituellement considéré comme un fragment acentrique en excès.

### 2.2

#### **taux de base**

fréquence spontanée (ou nombre) de micronoyaux dénombrés sur des échantillons ou des individus témoins

### 2.3

#### **biais**

erreur statistique à l'échantillonnage ou lors de la mesure, qui est due au fait de favoriser systématiquement certains résultats par rapport à d'autres

**2.4**

**cellules binucléées**

cellules ayant effectué une division nucléaire après une stimulation mitogénique et type de cellule dans lequel les micronoyaux sont dénombrés

Note 1 à l'article: ces cellules sont regroupées dans un milieu de culture contenant de la cytochalasine B, qui est un inhibiteur de la cytodierèse.

**2.5**

**laboratoire d'analyse des CBMN**

laboratoire qui pratique la dosimétrie biologique par le test des CBMN

**2.6**

**anneau centrique**

chromosome circulaire aberrant résultant de la jonction de deux points de cassure sur les différents bras d'un même chromosome (généralement accompagné d'un fragment acentrique)

**2.7**

**centromère**

région spécialisée d'un chromosome portant une constriction, réunissant les deux chromatides sœurs et qui apparaît pendant la mitose

**2.8**

**chromosome**

structure qui porte l'information génétique

Note 1 à l'article: normalement, 46 de ces structures sont contenues dans le noyau d'une cellule humaine. Pendant la division nucléaire, ils se condensent pour former des éléments de forme caractéristique.

**2.9**

**chromatide**

un des deux brins d'un chromosome dupliqué qui sont réunis par le centromère

Note 1 à l'article: les chromatides se séparent pendant la mitose pour s'individualiser comme des chromosomes.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/06e6cbe0-3330-4d12-9886-61beb0fe0a66/iso-17099-2014>

**2.10**

**intervalle de confiance**  
intervalle statistique autour d'une quantité estimée à l'intérieur de laquelle la valeur de la quantité est attendue avec une certaine probabilité spécifiée

**2.11**

**cytochalasine B**

**cytoB**

réactif utilisé pour bloquer la cytodierèse pendant la division cellulaire et permettant d'identifier les cellules ayant effectué une seule division comme des cellules binucléées

Note 1 à l'article: les cellules binucléées sont les cellules dans lesquelles les micronoyaux sont spécifiquement dénombrés.

**2.12**

**dicentrique**

chromosome aberrant portant deux centromères résultant de la jonction des morceaux de deux chromosomes coupés (généralement accompagné d'un fragment acentrique)



**2.13****hybridation fluorescente in situ  
FISH**

technique basée sur l'utilisation de séquences spécifiques d'ADN comme sondes pour des régions particulières du génome, permettant de visualiser ou « peindre » des régions chromosomiques en différentes couleurs par la fixation de divers fluorochromes

Note 1 à l'article: cette technique permet la détection de dommages impliquant des échanges entre des morceaux d'ADN (habituellement des chromosomes entiers) peints différemment.

**2.14****interphase**

période du cycle cellulaire entre deux divisions mitotiques

**2.15****transfert linéique d'énergie****TLE**

quotient dE/dl, défini par la Commission Internationale des Unités et Mesures Radiologiques (ICRU) comme l'énergie moyenne (dE) localement déposée dans le milieu par une particule chargée, par unité de longueur de la trajectoire parcourue (dl)

**2.16****métaphase**

deuxième phase de la mitose au cours de laquelle la membrane nucléaire est dissoute et les chromatides sont condensés au maximum et alignés pour la division au niveau de la plaque équatoriale

**2.17****micronoyau****MN**

petit noyau formé au cours de la division nucléaire et de la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase/télophase de la mitose, à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes acentriques retardataires

Note 1 à l'article: plus de 90 % des micronoyaux radio-induits résultent de fragments de chromosomes acentriques abandonnés.

**2.18****taux de détection minimum****MDL**

quantité mesurable la plus faible (fréquence ou dose, par exemple) qui est détectée avec une probabilité  $\beta$  de non-détection (erreur de Type II) tout en acceptant une probabilité  $\alpha$  de décider par erreur qu'une quantité positive (différente de zéro) est présente dans un échantillon témoin adéquat (erreur de Type I)

**2.19****dose minimum détectable**

la plus faible dose supplémentaire pour laquelle la limite inférieure de l'intervalle de confiance de Poisson à 95 % est supérieure à 0, de sorte qu'il y a 97,5 % de chances que la dose reçue en excès du taux de base normal soit supérieure à 0

**2.20****index de division nucléaire**

index dans le test des CBMN qui est calculé à partir de la fréquence relative des cellules mononucléées, binucléées et multinucléées

Note 1 à l'article: cet index fournit une mesure de l'inhibition de la division nucléaire.

**2.21****précision**

dispersion des mesures par rapport à une valeur moyenne ou une tendance centrale

## 2.22

### **assurance de la qualité**

actions planifiées et systématiques nécessaires pour apporter l'assurance qu'un procédé, une mesure ou un service ont satisfait à des exigences spécifiées en matière de qualité

EXEMPLE Dose spécifiée dans la pratique du laboratoire d'analyse.

## 2.23

### **contrôle de la qualité**

partie de l'assurance de la qualité qui a pour objectif de vérifier que les systèmes et les principes correspondent aux exigences prédéfinies

## 3 Méthodologie du test des micronoyaux

### 3.1 Généralités

Dans la présente Norme internationale, la fréquence de micronoyaux dénombrés par microscopie dans des cultures de lymphocytes humains provenant du sang périphérique bloqués binucléés en cytotiérèse, est utilisée pour l'estimation de la dose reçue après une exposition suspectée à des rayonnements ionisants.

Les lymphocytes sont mis en culture par une méthode qui permet d'identifier, par leur aspect binucléé, les cellules bloquées en cytotiérèse qui n'ont effectué qu'une seule division cellulaire. Cette méthode nécessite du sang total ou des lymphocytes isolés des autres éléments du sang, incubés dans un milieu de culture contenant un mitogène permettant le dénombrement des micronoyaux dans les cellules binucléées de première génération. Un agent de blocage de la cytotiérèse, la cytochalasine B, est ajouté au moins 6 h avant le début de la première mitose afin de bloquer la division des lymphocytes à l'état de cellules binucléées, après la fin de la division nucléaire. La durée de la culture et la période d'incubation de l'agent bloquant sont optimisées pour assurer une fréquence adaptée de cellules binucléées.

Les cellules binucléées sont recueillies par centrifugation, placées dans une solution hypotonique et fixées dans un mélange de méthanol et d'acide acétique. Les cellules fixées sont étalées sur des lames de microscope et colorées. Dans le cas des lymphocytes isolés, il est également acceptable d'effectuer une cyto-centrifugation des cellules sur lames, suivie d'un séchage à l'air, d'une fixation au méthanol et d'une coloration. Il convient que le laboratoire d'analyse des CBMN produise une documentation détaillant le protocole suivi pour la culture des cellules, le recueil des cellules binucléées et leur coloration.

Les lames de microscope portant les cellules colorées sont méthodiquement parcourues afin d'identifier les cellules binucléées adéquates. La fréquence de micronoyaux dénombrés dans un nombre approprié de cellules binucléées est convertie en une estimation de dose de rayonnement par référence à des données de calibration.

### 3.2 Exigences générales relatives au laboratoire

Il convient que le laboratoire dispose des appareillages requis pour la protection contre les dangers biologiques de la culture de tissus, ainsi que des équipements couramment utilisés pour la culture tissulaire des lymphocytes, la séparation des cellules, la préparation des lames et le dénombrement par microscopie des cellules et des structures subcellulaires telles que les micronoyaux. Il convient que le laboratoire conserve des documents d'assurance de la qualité des équipements utilisés pour la culture des cellules tels que hottes à flux laminaire, pipettes, incubateur, etc. - y compris ceux décrivant leur étalonnage périodique.

### 3.3 Demandes d'analyse et prélèvement de sang

Tout en respectant la réglementation nationale, il convient que la demande d'analyse soit normalement formulée par un médecin représentant le patient, ou par le patient lui-même. Elle pourrait également être requise dans un cadre légal. Dans tous les cas où cela s'avère possible, le prélèvement de sang pour l'analyse des micronoyaux doit être effectué avec le consentement éclairé du patient. Il est conseillé au chef du laboratoire de conserver une trace du consentement éclairé du patient et il convient que le

patient indique également l'identité des personnes qu'il autorise à recevoir les données. Pour les mineurs, le consentement éclairé doit être obtenu auprès du parent/tuteur.

L'équipe médicale (par exemple médecin, infirmière, etc.) est tenue de programmer le prélèvement de sang et l'expédition de manière à garantir que le laboratoire reçoive l'échantillon sanguin dans les meilleures conditions possibles. Le but est d'éviter d'abandonner l'échantillon de sang pendant plusieurs heures après le prélèvement et avant la prise en charge de l'échantillon pour le transport.

L'échantillon de sang est prélevé en utilisant un anticoagulant de type héparine de lithium ou de sodium, maintenu à température ambiante (à 20 °C environ) et mis en culture dès que possible, mais avant 72 h. Dans certains cas inévitables entraînant un délai allant au-delà de 72 h, une préparation correcte des échantillons est toujours possible à condition de les conserver en prenant toutes les précautions utiles, notamment en utilisant des poches de gel à température ambiante pour maintenir une température de 20 °C.

### 3.4 Culture des cellules

Chaque laboratoire d'analyse doit établir le protocole de test des CBMN et produire une documentation adaptée. Les protocoles utilisés pour la courbe de calibration et les estimations de doses des échantillons de patients doivent être identiques. Plusieurs aspects critiques doivent être respectés.

- a) Le sang utilisé pour établir les courbes de calibration doit être incubé pendant 2 h à 37 °C juste après l'irradiation et avant la culture des échantillons.
- b) Il convient de dupliquer les cultures pour permettre la détermination du coefficient de variation intra-expérimental.
- c) Les cellules doivent être cultivées à 37 °C ± 0,5 °C sous forme de sang total, de suspension de lymphocytes enrichie (couche leuco-plaquettaire) ou de lymphocytes isolés.
- d) Le récipient de culture doit être stérile et manipulé de manière à éviter toute contamination microbienne.
- e) Des milieux de culture spécifiques permettant aux lymphocytes du sang périphérique de proliférer doivent être utilisés.

EXEMPLE Par exemple, les milieux RPMI-1640, Ham's F10, MEM ou McCoy complétés avec 10 à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF), 200 mM L-glutamine, et de la pénicilline/streptomycine (100 UI ml<sup>-1</sup>/100 µg·ml<sup>-1</sup>) sont couramment utilisés.

- f) Un mitogène (par exemple, phytohémagglutinine (PHA)) doit être ajouté au milieu pour stimuler la mitose des lymphocytes.
- g) De la cytochalasine B (cytoB) doit être ajoutée à la culture cellulaire, 24 h à 44 h après la stimulation mitogénique à une concentration comprise entre 3,0 µg/ml et 6,0 µg/ml, afin de bloquer la cytotérièse des cellules au cours de leur première division nucléaire.
- h) La période d'arrêt des cellules en culture est primordiale pour maximiser le nombre de cellules binucléées et minimiser le nombre de cellules mononucléées et multinucléées. Elle doit être adaptée en fonction des conditions de culture habituelles de chaque laboratoire d'analyse des CBMN. La période recommandée pour l'arrêt des cellules en culture après la stimulation mitogénique est de 72 h mais dans certaines conditions (par exemple lorsqu'un retard mitotique est attendu), cette période peut être allongée. La culture des cellules est généralement arrêtée 24 h à 48 h après l'ajout de cytochalasine B.
- i) Les cellules peuvent être traitées avec une solution hypotonique telle que KCl 0,075 M pendant 10 min à 15 min pour les faire gonfler avant la fixation.
- j) Les cellules peuvent être fixées en suspension puis transférées sur des lames. Elles peuvent également être transférées sur des lames par cyto centrifugation, puis fixées sur ces lames après séchage à l'air. Dans le premier cas, les cellules doivent être fixées dans un mélange de fixateur fraîchement préparé (par exemple un mélange 5:1 de méthanol et d'acide acétique) tout en les agitant pour empêcher leur agglutination, et doivent ensuite être lavées 3 ou 4 fois avec le même

fixateur jusqu'à ce que la suspension de cellules soit limpide. Dans le second cas, les cellules doivent être fixées dans du méthanol absolu.

- k) Si la conservation des cellules fixées est nécessaire, les suspensions de cellules doivent alors être placées au congélateur à - 20 °C.
- l) Les lames doivent être préparées pour garantir l'intégrité de la membrane cellulaire et permettre une identification non ambiguë des micronoyaux dans les cellules binucléées. Les conditions d'humidité et de température peuvent être ajustées pour accroître la qualité de l'étalement.
- m) Il convient de dupliquer les cultures pour chaque échantillon de sang de chaque individu.

### 3.5 Coloration

Les cellules doivent être colorées de manière appropriée pour pouvoir clairement visualiser les noyaux et les micronoyaux. Les colorants couramment utilisés incluent, sans toutefois s'y limiter, le Giemsa (pour la microscopie sur fond clair), le DAPI et l'acridine orange (pour la microscopie de fluorescence). Le colorant utilisé doit être spécifique aux noyaux et aux micronoyaux afin d'éviter toute coloration artéfactuelle d'autres structures cellulaires susceptibles de ressembler à des micronoyaux (centrioles, par exemple).

### 3.6 Microscopie

Un microscope à fluorescence ou à fond clair est utilisé selon le colorant employé. Pour le dénombrement des cellules et des micronoyaux, il est nécessaire d'observer les cellules avec un grossissement minimal de 400 ×. Toutefois, il est recommandé d'utiliser un grossissement supérieur (par exemple 1 000 ×) pour optimiser le dénombrement.

### 3.7 Dénombrement visuel des lames

#### 3.7.1 Généralités

Chaque échantillon doit être observé par deux personnes, chacune dénombrant les micronoyaux présents dans au moins 500 cellules binucléées (pour un total d'au moins 1 000 cellules binucléées) provenant de différentes lames. Un nombre réduit de cellules binucléées peut être dénombré pour les échantillons à dose élevée ou en mode de triage (voir [Article 10](#)). Il convient également d'enregistrer la répartition des micronoyaux dans les cellules binucléées. Il convient que les opérateurs soient familiarisés avec le dénombrement des micronoyaux dans les lymphocytes (voir [Article 9](#)).

#### 3.7.2 Critères de dénombrement

##### 3.7.2.1 Critères de sélection des cellules binucléées observées pour la fréquence des micronoyaux

Il convient que les cellules bloquées en cytodiérèse dont la fréquence des MN peut être dénombrée présentent les caractéristiques suivantes:

- a) les cellules doivent être binucléées (BN);
- b) les deux noyaux d'une cellule BN doivent présenter des membranes nucléaires intactes et être situés dans les mêmes limites cytoplasmiques;
- c) les deux noyaux d'une cellule BN doivent présenter une taille, une couleur et une intensité de coloration sensiblement identiques;
- d) les deux noyaux d'une cellule BN peuvent être séparés ou reliés par un ou plusieurs ponts nucléoplasmiques fins dont la largeur n'excède pas 1/4 du diamètre nucléaire;