

---

---

**Qualité de l'eau — Détermination de  
la toxicité aiguë d'échantillons d'eau  
et de produits chimiques vis-à-vis de  
la lignée cellulaire de branchies de  
poissons (RTgill-W1)**

*Water quality — Determination of acute toxicity of water samples  
and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)*  
**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 21115:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019>



## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 21115:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +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

<b>Avant-propos</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vi</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
4.1    Essai de viabilité cellulaire.....	2
4.2    Principales différences du mode opératoire de l'essai sur échantillons d'eau et sur produits chimiques.....	3
<b>5</b> <b>Interférences</b> .....	<b>4</b>
5.1    Effets de matrice dus aux échantillons d'effluent.....	4
5.2    Interférences des constituants de l'eau ou des produits chimiques avec les essais utilisant un indicateur coloré fluorescent.....	4
<b>6</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>5</b>
6.1    Généralités.....	5
6.2    Réactifs prêts à l'emploi.....	5
6.3    Solutions préparées extemporanément.....	6
<b>7</b> <b>Appareillage et matériel</b> .....	<b>8</b>
7.1    Équipement général.....	8
7.2    Préparation de l'échantillon d'eau complet/ex.....	9
7.3    Ensemencement des cellules sur plaque.....	9
7.4    Préparation/distribution des solutions mères.....	10
7.5    Échantillonnage pour l'analyse chimique.....	10
7.6    Détection de la cytotoxicité.....	10
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>10</b>
8.1    Lignée cellulaire utilisée.....	10
8.2    Ensemencement des cellules dans des plaques de 24 puits.....	11
8.2.1    Généralités.....	11
8.2.2    Préparation du matériel et des solutions d'ensemencement des cellules.....	11
8.2.3    Ensemencement des cellules: déroulement étape par étape.....	11
8.3    Exposition des cellules.....	13
8.3.1    Généralités.....	13
8.3.2    Exposition des cellules aux échantillons d'eau.....	13
8.3.3    Exposition des cellules à des produits chimiques.....	18
8.4    Détermination de la cytotoxicité.....	22
8.4.1    Généralités.....	22
8.4.2    Contrôle visuel des dommages cellulaires.....	22
8.4.3    Préparation du matériel et des solutions de mesure de la cytotoxicité.....	23
8.4.4    Mesurage de la cytotoxicité: déroulement étape par étape.....	23
8.4.5    Paramètres applicables au mesurage de la fluorescence.....	24
8.4.6    Analyses chimiques des échantillons pour essai.....	24
<b>9</b> <b>Préparation et expression des résultats</b> .....	<b>24</b>
<b>10</b> <b>Critères de validité de l'essai</b> .....	<b>25</b>
10.1    Puits «témoins sans cellules».....	25
10.2    Témoin positif dans le L-15/ex.....	26
10.3    Témoin positif dans w-ws/ex:.....	26
10.4    Témoin solvant.....	26
<b>Annexe A (informative) Culture cellulaire de routine de RTgill-W1</b> .....	<b>27</b>
<b>Annexe B (informative) Performance de l'essai sur la lignée cellulaire RTgill-W1</b> .....	<b>33</b>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 21115:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019>

## 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 attirée 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 nature volontaire des normes, de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute autre information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Des millions de poissons sont utilisés chaque année pour évaluer la toxicité d'échantillons d'eau, tels que les effluents, ou de produits chimiques. Utiliser un autre modèle d'essai réduirait non seulement les besoins en animaux, mais permettrait également d'accélérer les essais tout en réduisant les volumes utilisés et la production de déchets. L'utilisation d'embryons de poisson-zèbre avant l'alimentation autonome comble partiellement le besoin d'essais alternatifs de toxicité aiguë sur les poissons.

Le présent document décrit un mode opératoire qui évalue la toxicité aiguë sur les poissons à l'aide d'une lignée cellulaire permanente de poisson. Les travaux comparatifs utilisant les embryons de poisson-zèbre et la ligne cellulaire ont montré qu'ils sont censés produire des résultats similaires, c'est-à-dire dans une gamme d'environ un facteur 10 reposant sur les concentrations mesurées. Ils ont également un inconvénient commun: une capacité limitée à détecter les composés neurotoxiques. Cependant, les besoins en ressources diffèrent. Par exemple, bien que l'utilisation de la lignée cellulaire permette de ne pas utiliser de poissons du tout et de réduire la durée entre l'exposition et l'obtention des résultats d'essai, elle exige des techniques de culture en milieu stérile. Ainsi, le choix de l'essai peut être guidé par les ressources disponibles et les besoins.

Dans le mode opératoire décrit dans le présent document, la lignée cellulaire de poisson est la lignée cellulaire RTgill-W1<sup>[1]</sup> établie à partir de branchies de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Elle est disponible dans le commerce auprès de l'ATCC® CRL-2523<sup>TM</sup><sup>1)</sup>. Deux modes opératoires de structure similaire sont décrits: un pour les échantillons d'eau, tels que les effluents, et un pour les essais sur produits chimiques.

La norme ISO 15088<sup>[2]</sup> et la ligne directrice de l'OCDE 236<sup>[3]</sup> concernent également la prédiction de la toxicité aiguë des eaux résiduaires et des produits chimiques sur les poissons, à partir d'embryons de poisson-zèbre.

STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)  
ISO 21115:2019  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019>

---

1) ATCC® CRL-2523<sup>TM</sup> est l'appellation commerciale d'un produit fourni par ATCC, États-Unis. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

# Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë d'échantillons d'eau et de produits chimiques vis-à-vis de la lignée cellulaire de branchies de poissons (RTgill-W1)

**AVERTISSEMENT** — Travailler avec des produits chimiques ou des échantillons d'eau requiert des mesures de sécurité lors de leur manipulation. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées.

**IMPORTANT** — Il est indispensable que les essais menés selon le présent document soient effectués par un personnel convenablement formé.

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la toxicité aiguë sur les poissons à l'aide de la lignée cellulaire permanente établie à partir de branchies de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), RTgill-W1. Les cellules en monocouche confluite cultivées dans des plaques de culture tissulaire de 24 puits sont exposées à des échantillons d'eau, tels que des eaux de surface ou différents types d'effluents, ou à des produits chimiques pendant 24 h. Ensuite, la viabilité cellulaire est évaluée à l'aide d'indicateurs colorés fluorescents de la viabilité cellulaire (voir 4.1). Les données sont ensuite exprimées sous forme du pourcentage d'un témoin non exposé et la toxicité est quantifiée d'après la courbe concentration-effet du pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du pourcentage de concentration en effluent ou en produit chimique (voir l'Article 9).

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

## 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online Browsing Platform (OBP): disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### L-15/ex

milieu exempt de protéine, contenant les mêmes quantités de sels, galactose et pyruvate que le milieu Leibovitz L-15[4], utilisé pour l'exposition («/ex») des cellules RTgill-W1 aux produits chimiques ou aux échantillons d'eau

Note 1 à l'article: Voir 6.3.7.

### 3.2

#### échantillon d'eau complet/ex

#### échantillon d'eau complet/ex

échantillon d'eau dont l'osmolalité a été ajustée par l'ajout de sels, galactose et pyruvate pour être similaire au milieu L-15/ex (3.1)

Note 1 à l'article: Voir 6.3.8, 6.3.9 et 8.3.2.3.

### 3.3

#### témoin négatif

milieu d'exposition *L-15/ex* (3.1) exempt de produit chimique d'essai

### 3.4

#### témoin positif

substance de référence adéquatement caractérisée qui, lorsqu'elle est évaluée par une méthode d'essai spécifique, démontre la capacité du système d'essai à produire une réponse appropriée reproductible

Note 1 à l'article: Les protocoles présentés dans le présent document ont été validés en utilisant la 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA) comme témoin positif car elle est facile à manipuler et a été utilisée comme témoin positif dans l'ISO 15088[2] et dans la ligne directrice de l'OCDE 236[3] (voir Introduction). D'autres substances peuvent être appropriées comme témoin positif à condition qu'elles produisent une réponse adéquate reproductible dans le système d'essai.

### 3.5

#### témoin solvant

milieu d'exposition [*L-15/ex* (3.1)] supplémenté avec la concentration respective du co-solvant utilisé, par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO), si nécessaire

Note 1 à l'article: Le témoin solvant s'applique seulement si un co-solvant tel que le DMSO est requis.

### 3.6

#### témoin solvant w-ws/ex

*échantillon d'eau complet/ex* (3.2) supplémenté avec la concentration respective du solvant utilisé, par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour l'exposition au produit chimique *témoin positif* (3.4), si nécessaire

### 3.7

#### témoin sans cellules

deux puits par plaque d'essai sans cellules, l'un recevant le milieu *L-15/ex* (3.1) et l'autre recevant soit 100 % d'*échantillon d'eau complet/ex* (3.2) soit le milieu *L-15/ex* (3.1) avec la plus forte concentration en produit chimique d'essai, pour déterminer le bruit de fond de la fluorescence

Note 1 à l'article: Voir 5.2.

### 3.8

#### concentration efficace

$CE_x$

concentration en matériau d'essai qui provoque x pourcent de changement de viabilité cellulaire par rapport au *témoin négatif* (3.3) ou au *témoin solvant* (3.5) pendant un intervalle de temps spécifié

Note 1 à l'article: La  $CE_{50}$  est la concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est de 50 % par rapport au témoin (solvant) (voir l'Article 9).

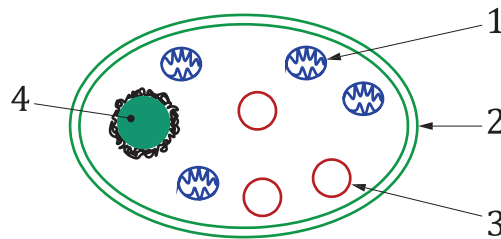
## 4 Principe

### 4.1 Essai de viabilité cellulaire

Les échantillons d'eau et les produits chimiques peuvent exercer des effets toxiques sur les cultures cellulaires. L'essai décrit dans le présent document permet de détecter trois critères de toxicité différents sur le même groupe de cellules. L'essai est effectué par photométrie en mesurant la fluorescence d'indicateurs colorés de toxicité et les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à un groupe témoin non traité.

L'essai repose sur la combinaison de trois indicateurs colorés fluorescents: alamarBlue, CFDA-AM et le rouge neutre, qui mesurent, respectivement, l'activité métabolique, l'intégrité de la membrane cellulaire et l'intégrité de la membrane lysosomale, voir Figure 1[5].





### Légende

- 1 activité métabolique
- 2 intégrité de la membrane cellulaire
- 3 intégrité de la membrane lysosomale
- 4 noyau

**Figure 1 — Trois indicateurs colorés fluorescents mesurant la cytotoxicité d'après différentes cibles**

L'AlamarBlue™<sup>2)</sup> est une préparation commerciale du colorant résazurine<sup>[6]</sup> et tous les modes opératoires du présent document utilisent l'AlamarBlue. D'autres indicateurs colorés comparables, à base de résazurine, sont disponibles dans le commerce, notamment le PrestoBlue®<sup>3)</sup>, et peuvent être utilisés de manière interchangeable sans adaptation. La résazurine pénètre dans les cellules sous sa forme non fluorescente et est convertie en produit fluorescent, la résorufine, par les oxydoréductases des membranes mitochondriales, microsomales ou cytoplasmiques. Une réduction de la fluorescence de l'AlamarBlue indique une diminution du métabolisme cellulaire, y compris une rupture des membranes mitochondriales.

Le 5-carboxyfluorescéine diacétate acétoxy méthyl ester (CFDA-AM) diffuse rapidement dans les cellules et est converti par les estérases non spécifiques de la membrane plasmique des cellules vivantes en un produit fluorescent, la 5-carboxyfluorescéine. Le produit diffuse lentement à l'extérieur des cellules intactes de poisson<sup>[4]</sup>. Ainsi, une diminution de la fluorescence du CFDA-AM indique une perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique.

Le rouge neutre diffuse dans les cellules et s'accumule dans les lysosomes<sup>[7]</sup>. La rupture des lysosomes entraîne donc une diminution de la fluorescence du rouge neutre.

## 4.2 Principales différences du mode opératoire de l'essai sur échantillons d'eau et sur produits chimiques

Si les essais portent sur des échantillons d'eau, l'osmolalité est d'abord ajustée pour s'assurer que les conditions d'exposition sont isotoniques lors de la dilution de l'échantillon dans le milieu d'exposition cellulaire. L'échantillon est ensuite filtré afin d'éviter les interférences dues aux micro-organismes (voir [8.3.2.3](#)). La viabilité cellulaire est ensuite quantifiée comme décrit en [4.1](#).

Si les essais portent sur des produits chimiques, le milieu d'exposition cellulaire est prélevé au début et à la fin de la période d'exposition et les concentrations en produits chimiques sont quantifiées pour déterminer les concentrations d'exposition réelles. Il convient de disposer d'une méthode analytique fiable pour la quantification du produit chimique d'essai avec une exactitude et une limite de détection

2) AlamarBlue™ est l'appellation commerciale d'un produit fourni par Thermo Fisher Scientific, États-Unis. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

3) PrestoBlue® est l'appellation commerciale d'un produit fourni par Thermo Fisher Scientific, États-Unis. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

indiquées. Cela permet d'obtenir les concentrations efficaces provoquant 50 % des effets (valeur CE<sub>50</sub>) sur la base des concentrations mesurées.

## 5 Interférences

### 5.1 Effets de matrice dus aux échantillons d'effluent

La matrice indéfinie d'un échantillon d'effluent (ou d'eau plus généralement) peut limiter la performance de l'essai sur lignée cellulaire à détecter des substances toxiques (la substance toxique pouvant être masquée par la matrice). Pour cette raison, chaque échantillon d'effluent est soumis à essai simultanément seul et en présence d'un produit chimique de référence comme témoin positif. Pour les essais sur effluents avec le témoin positif, le produit chimique de référence, c'est-à-dire la 3,4-DCA, est ajouté à l'effluent dans une gamme de concentration censée produire une courbe concentration-effet intégrale et des valeurs CE<sub>50</sub> telles qu'indiquées à l'[Article 10](#).

Si l'effluent est intrinsèquement toxique, avec une courbe concentration-effet interprétable, l'effluent témoin positif contenant la 3,4-DCA ne conduira pas à une courbe concentration-effet interprétable et est donc obsolète (par exemple, voir [B.2](#), [Tableau B.2](#) et [Figure B.1](#), B, échantillon 6/site E). Cependant, étant donné que de nombreux effluents ne présentent pas de toxicité aiguë, l'obtention d'une courbe concentration-effet avec la 3,4-DCA indiquera que le mode opératoire d'essai se déroule correctement en cas de toxicité réduite ou inexistante de l'effluent. Un décalage vers la droite de la courbe concentration-effet avec la 3,4-DCA dans la matrice d'effluent par rapport au L-15/ex (ce qui signifie que la partie inférieure de la courbe est manquante — une viabilité cellulaire de 0 % ne peut plus être observée) indique que la matrice réduit la disponibilité du produit chimique pour les cellules mais que le mode opératoire d'essai a fonctionné (par exemple, voir [B.2](#), [Tableau B.2](#) et [Figure B.1](#), A, échantillon 3/site B). Un décalage vers la gauche de la courbe concentration-effet (ce qui signifie que la partie supérieure de la courbe est manquante — une viabilité cellulaire de 100 % ne peut plus être observée) indique que le mode opératoire d'essai a fonctionné mais que l'effluent provoque intrinsèquement une certaine toxicité pour les cellules qui est favorisée par la contrainte supplémentaire de la 3,4-DCA (par exemple, voir [B.2](#), [Tableau B.2](#) et [Figure B.1](#), D, échantillon 17/site O).

Dans certains cas, des précipités peuvent se former lorsque des sels sont ajoutés (voir [8.3.2.3](#)). Cela n'exclut en rien de soumettre à essai l'échantillon d'eau car la formation de précipités n'interfère pas intrinsèquement avec l'essai (voir également Référence [8]). Cependant, si la viabilité cellulaire est affectée par ce type d'échantillon d'eau, il est difficile de savoir si l'effet est uniquement provoqué par les précipités ou s'il est lié aux substances toxiques présentes dans les échantillons.

### 5.2 Interférences des constituants de l'eau ou des produits chimiques avec les essais utilisant un indicateur coloré fluorescent

Deux puits témoins sans cellules par plaque d'essai de 24 puits sont nécessaires pour quantifier le bruit de fond de la fluorescence des indicateurs colorés. Ces puits sans cellules sont traités de la même manière que les puits contenant des cellules. 2 ml de L-15/ex sont ajoutés dans l'un des deux puits témoins sans cellules. Dans la mesure où les constituants indéfinis de l'eau ou les produits chimiques peuvent produire un bruit de fond de fluorescence, un deuxième puits témoin sans cellules est inclus pour les essais sur échantillons d'eau ou sur produits chimiques afin de détecter les éventuelles interférences entre l'échantillon d'eau complet ou le produit chimique d'essai et les indicateurs colorés fluorescents. 2 ml de 100 % d'échantillon d'eau complet/ex ou la plus forte concentration en produits chimiques est ajoutée dans ce puits (voir [8.3.2.6](#), [8.3.2.9](#) et [8.3.3.5](#)). Si une interférence est détectée (c'est-à-dire, une fluorescence supérieure/inférieure de 20 % par rapport à l'autre puits témoin sans cellules), une plaque de référence témoin sans cellules est requise lors d'un essai supplémentaire avec cet échantillon d'eau ou ce produit chimique particulier incluant toutes les dilutions (plaque sans cellules traitée de la même manière que la plaque d'exposition). Ce type d'interférence n'a encore jamais été détecté et semble donc rare. Si aucune interférence n'est détectée, les deux puits témoins sans cellules sont traités comme des valeurs témoins sans cellules (voir [l'Article 9](#)).

## 6 Réactifs

### 6.1 Généralités

Dans la mesure du possible, utiliser uniquement des produits chimiques pour culture cellulaire.

### 6.2 Réactifs prêts à l'emploi

**6.2.1 Sérum bovin**, sérum fœtal bovin (FBS).

Ne pas inactiver thermiquement le FBS.

**6.2.2 Gentamicine**, 10 mg/ml ( $C_{20}H_{40}N_4O_{10}$ , 496,56 g/mol, CAS n°: 49863-47-0).

**6.2.3 Trypsine**, 0,25 % dans le tampon phosphate (PBS) sans  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  (CAS n°: 9002-07-7).

**6.2.4 Versène**, 0,2 g/l d'EDTA( $Na_4$ ) dans le PBS ( $C_{10}H_{14}N_2Na_4O_9$ , 398,19 g/mol, CAS n°: 194491-31-1).

**6.2.5 Milieu L-15 de Leibovitz**, avec glutamine et sans rouge de phénol.

**6.2.6 Formaldéhyde**, 37 % (m/v) ( $CH_2O$ , 30,03 g/mol, CAS n°: 50-00-0).

**6.2.7 Acide acétique**,  $\geq 99,5$  % ( $C_2H_4O_2$ , 60,05 g/mol, CAS n°: 64-19-7).

**6.2.8 Solution d'AlamarBlue**, DAL1100; Invitrogen **ou PrestoBlue**, A13262; Invitrogen (résazurine:  $C_{12}H_7NO_4$ , 229,19 g/mol, CAS n°: 550-82-3)<sup>4)</sup>.

**6.2.9 CFDA-AM**, ( $C_{28}H_{20}O_{11}$ , 532,46 g/mol, CAS n°: 124412-00-6).

**6.2.10 Solution de rouge neutre**, ( $C_{16}H_{17}IN_4$ , 288,78 g/mol, CAS n°: 553-24-2).

**6.2.11 Tampon PBS de Dulbecco (PBS)**, 10x, avec  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ .

**6.2.12 Diméthylsulfoxyde (DMSO)**,  $\geq 99,9$  % ( $C_2H_6SO$ , 78,13 g/mol, CAS n°: 67-68-5).

**6.2.13 Éthanol**, absolu, pour analyse ( $C_2H_6O$ , 46,07 g/mol, CAS n°: 64-17-5).

**6.2.14 Chlorure de calcium**  $\geq 96$  % ( $CaCl_2$ , 110,98 g/mol, CAS n°: 10043-52-4).

**6.2.15 Chlorure de sodium**  $\geq 99$  % ( $NaCl$ , 58,44 g/mol, CAS n°: 7647-14-5).

**6.2.16 Chlorure de potassium**  $\geq 99$  % ( $KCl$ , 74,55 g/mol, CAS n°: 7447-40-7).

**6.2.17 Sulfate de magnésium**  $\geq 98$  % ( $MgSO_4$ , 120,37 g/mol, CAS n°: 7487-88-9).

**6.2.18 Chlorure de magnésium**  $\geq 97$  % ( $MgCl_2$ , 95,21 g/mol, CAS n°: 7786-30-3).

**6.2.19 Galactose**,  $\geq 96$  % ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,16 g/mol, CAS n°: 59-23-4).

4) Il s'agit d'exemples de fournisseurs capables de fournir des produits chimiques appropriés pour l'essai. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce fournisseur. Des produits similaires sont disponibles auprès d'autres fournisseurs.

**6.2.20 Pyruvate de sodium**  $\geq 99\%$  ( $C_3H_3O_3Na$ , 110,04 g/mol, CAS n°: 113-24-6).

**6.2.21 Phosphate de sodium dibasique**  $\geq 99\%$  ( $Na_2HPO_4$ , 141,96 g/mol, CAS n°: 7558-79-4).

**6.2.22 Phosphate de potassium monobasique**,  $\geq 99\%$  ( $KH_2PO_4$ , 136,09 g/mol, CAS n°: 7778-77-0).

**6.2.23 Eau déionisée**, résistivité:  $\leq 18,2 M\Omega \cdot cm$ .

**6.2.24 3,4-Dichloroaniline** ( $C_6H_5Cl_2N$ , 162,02 g/mol, CAS n°: 95-76-1).

Utiliser uniquement la qualité analytique.

### 6.3 Solutions préparées extemporanément

#### 6.3.1 Milieu de culture complet L-15

Ajouter à 500 ml de L-15:

- 25 ml de FBS;
- 2,5 ml de gentamicine.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas trois mois à  $(4 \pm 1) ^\circ C$ .

#### 6.3.2 Solution saline 20x A (pour L-15/ex et w-ws/ex)

- 80 g de NaCl;
- 4,0 g de KCl;
- 0,98 g de  $MgSO_4$ ;
- 0,94 g de  $MgCl_2$ .

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8ebac5d-7334-4dca-b4fd-34281dacbc25/iso-21115-2019>

Compléter à 300 ml avec de l'eau déionisée et passer à l'autoclave.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas six mois à température ambiante.

#### 6.3.3 Solution saline 30x B (pour L-15/ex et w-ws/ex)

- 1,4 g de  $CaCl_2$ .

Compléter à 33,33 ml avec de l'eau déionisée et passer à l'autoclave.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas six mois à température ambiante.

#### 6.3.4 Solution saline 30x C (pour L-15/ex et w-ws/ex)

- 1,9 g de  $Na_2HPO_4$ ;
- 0,6 g de  $KH_2PO_4$ .

Compléter à 100 ml avec de l'eau déionisée et passer à l'autoclave.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas six mois à température ambiante.

#### 6.3.5 Solution de galactose 30x (pour L-15/ex et w-ws/ex)

- 9,0 g de galactose.

Compléter à 33,33 ml avec de l'eau déionisée.

Stériliser à travers un filtre (0,2 µm) et préparer des aliquotes de 3,33 ml.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas six mois à (-20 ± 1) °C.

### 6.3.6 Solution de pyruvate de sodium 30x (pour L-15/ex et w-ws/ex)

— 5,5 g de pyruvate de sodium.

Compléter à 33,33 ml avec de l'eau déionisée.

Stériliser à travers un filtre (0,2 µm) et préparer des aliquotes de 3,33 ml.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas six mois à (-20 ± 1) °C.

### 6.3.7 L-15/ex (à préparer dans des conditions d'asepsie)

— 30 ml de solution saline 20x A;

— 3,33 ml de solution saline 30x B;

— 10 ml de solution saline 30x C;

— 3,33 ml de solution de galactose 30x;

— 3,33 ml de solution de pyruvate de sodium 30x.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau déionisée stérilisée.

Il convient que la durée de conservation ne dépasse pas trois mois à température ambiante.

**6.3.8 Échantillon d'eau complet/ex (100 % de sels)** (à préparer dans des conditions d'asepsie pour préserver la stérilité des solutions mères)

— 3 ml de solution saline 20x A;

— 0,333 ml de solution saline 30x B;

— 1 ml de solution saline 30x C;

— 0,333 ml de solution de galactose 30x;

— 0,333 ml de solution de pyruvate de sodium 30x.

Compléter à 100 ml avec de l'eau.

À préparer extemporanément à chaque fois.

**6.3.9 Échantillon d'eau complet/ex (80 % de sels)** (à préparer dans des conditions d'asepsie pour préserver la stérilité des solutions mères)

— 2,4 ml de solution saline 20x A;

— 0,266 ml de solution saline 30x B;

— 0,8 ml de solution saline 30x C;

— 0,266 ml de solution de galactose 30x;

— 0,266 ml de solution de pyruvate de sodium 30x.

Compléter à 100 ml avec de l'eau.