

---

---

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

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

Sample Document

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

*Part 2: Mixed population method using the cell line V79*

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



**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.

Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](http://standards.iteh.ai)



**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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2009

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</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>3</b>
<b>5</b> <b>Interférences</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Réactifs et milieux</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b> <b>Critères relatifs à l'installation d'essai</b> .....	<b>8</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>8</b>
<b>10</b> <b>Évaluation et estimation</b> .....	<b>12</b>
<b>11</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>14</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Méthode à la bromodésoxyuridine (BrdU)</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Schémas d'évaluation</b> .....	<b>18</b>
<b>Annexe C</b> (normative) <b>Fraction S9</b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe D</b> (informative) <b>Données de fidélité</b> .....	<b>20</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>21</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 (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.

### 1 Domaine d'application

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

**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 artefacts 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  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Recouvrir les récipients sans serrage (par exemple à l'aide d'une feuille d'aluminium). Ne jamais les fermer de manière étanche.