NORME INTERNATIONALE

ISO 20046

Première édition
2019-03

Radioprotection — Critères de performance pour les laboratoires utilisant l'analyse des translocations visualisées par hybridation in situ fluorescente (FISH) pour évaluer l'exposition aux rayonnements ionisants

Radiological protection — Performance criteria for laboratories using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) translocation assay for assessment of exposure to ionizing radiation

Numéro de référence
ISO 20046:2019(F)

© ISO 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
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **v**

Introduction ..... **vi**

1 Domaine d'application **1**

2 Références normatives **1**

3 Termes et définitions **1**

4 Analyse des translocations par FISH **5**
4.1 Généralités 5
4.2 Culture et fixation 5
4.3 Types de coloration 6
4.4 Dénombrement 6
4.5 Exigences générales relatives au laboratoire 7

5 Responsabilité du demandeur **7**

6 Responsabilité du laboratoire **7**
6.1 Mise en place et maintenance d'un programme d'assurance de la qualité (AQ) 7
6.2 Responsabilité pendant le service 8

7 Confidentialité des informations personnelles **9**
7.1 Aperçu général 9
7.2 Applications du principe de confidentialité 9
7.2.1 Délégation de responsabilités au sein du laboratoire 9
7.2.2 Demandes d'analyse 9
7.2.3 Transmission d'informations confidentielles 9
7.2.4 Anonymat des échantillons 9
7.2.5 Consignation des résultats 10
7.2.6 Stockage des données et résultats 10

8 Exigences de sécurité relatives aux laboratoires **10**
8.1 Aperçu général 10
8.2 Exigences de sécurité microbiologique 10
8.3 Exigences de sécurité chimique 10
8.4 Exigences de sécurité optique 11
8.5 Plan de sécurité 12

9 Traitement des échantillons **12**
9.1 Culture et coloration 12
9.2 Dénombrement 13
9.2.1 Critères de dénombrement 13
9.2.2 Conversion des fréquences de translocation en équivalence génomique 13

10 Fréquences de base des translocations **14**

11 Courbes de calibration **15**
11.1 Sources de calibration 15
11.2 Établissement de la ou des courbes de calibration 15

12 Critères pour convertir une fréquence d'aberration mesurée en une estimation de dose absorbée **17**
12.1 Détermination de l'estimation de dose absorbée au corps entier et des limites de l'intervalle de confiance 17
12.1.1 Généralités 17
12.1.2 Comparaison avec la fréquence de base: caractérisation de la dose minimale détectable 17
12.1.3 Limites de l'intervalle de confiance pour le nombre de translocations 21
12.1.4 Ajustement pour la fréquence de base 22
12.1.5 Calcul de la dose absorbée 23

© ISO 2019 – Tous droits réservés

12.1.6 Calcul de l'incertitude sur la dose absorbée ... 23
12.1.7 Cas d'exposition aiguë et non aiguë ... 24
12.1.8 Autres scénarios d'exposition ... 24

13 Consignation des résultats ... 24
13.1 Généralités ... 24
13.2 Contenu du rapport (voir Annexe C pour découvrir un format normalisé) ... 25
13.3 Interprétation des résultats ... 25

14 Assurance et contrôle de la qualité ... 26
14.1 Aperçu général ... 26
14.2 Exigences spécifiques ... 26
14.2.1 Généralités ... 26
14.2.2 Contrôles de performance par comparaisons interlaboratoires ... 26
14.2.3 Contrôle de la qualification des opérateurs ... 27
14.2.4 Contrôle de performance du transport des échantillons ... 27
14.2.5 Contrôle de performance de l'intégrité des échantillons par le laboratoire de service ... 27
14.2.6 Contrôle de performance de l'appareillage ... 27
14.2.7 Contrôle de performance des protocoles expérimentaux ... 28
14.2.8 Contrôle de performance de la qualité de dénombrement ... 28
14.2.9 Contrôle de performance du rapport d'expertise ... 28

Annexe A (informative) **Exemples d'instructions pour le demandeur ... 29**

Annexe B (informative) **Exemple de questionnaire ... 31**

Annexe C (informative) **Exemple de rapport ... 33**

Annexe D (informative) **Tableau type pour le dénombrement des aberrations chromosomiques peintes ... 34**

Annexe E (informative) **Ajustement de la courbe dose-effet par la méthode du maximum de vraisemblance et calcul de l'erreur d'estimation de dose absorbée ... 36**

Annexe F (informative) **Processus d'estimation dosimétrique ... 37**

Bibliographie ... 43

 © ISO 2019 – Tous droits réservés

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).

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).

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, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 85, *Énergie nucléaire, technologies nucléaires, et radioprotection*, sous-comité SC 2, *Radioprotection*.

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.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

Introduction

L'objectif du présent document est de définir l'utilisation de l'analyse des translocations des chromosomes visualisées par hybridation in situ fluorescente (FISH) sur les lymphocytes du sang périphérique humain qui ont été exposés à des rayonnements ionisants. La dosimétrie biologique, fondée sur l'étude des aberrations chromosomiques, essentiellement le dénombrement des dicentriques, est devenue un élément de routine pour l'estimation dosimétrique en cas de surexposition accidentelle. Les dicentriques, cependant, disparaissent avec le temps après l'exposition, ce qui rend ce dénombrement utile uniquement à court terme après l'exposition. Les translocations sont toutefois plus stables, ce qui permet de faire des estimations dosimétriques longtemps après l'exposition ou après des expositions prolongées.

Le présent document fournit des lignes directrices pour effectuer l'analyse des translocations par FISH pour l'estimation dosimétrique en utilisant des modes opératoires documentés et validés. Il décrit également les exigences minimales pour évaluer la fréquence de translocation dans les lymphocytes du sang périphérique, en définissant précisément les aspects techniques de la coloration des chromosomes (nombre de chromosomes et types de peinture), de la sélection des types d'aberrations et de cellules, du dénombrement des aberrations, de la conversion de la fréquence d'aberration en dose, de l'analyse statistique, des problèmes liés aux expositions hétérogènes, chroniques ou anciennes et de l'extrapolation au génome complet. L'estimation dosimétrique à l'aide de l'analyse FISH est pertinente pour la prise en charge médicale, la radioprotection, le suivi dosimétrique et les exigences médico-légales.

Une partie de l'information contenue dans le présent document est incluse dans d'autres lignes directrices et publications scientifiques internationales et principalement dans la série de rapports techniques de l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA) sur la dosimétrie biologique. Cependant, le présent document développe et normalise l'assurance et le contrôle de la qualité ainsi que l'évaluation des performances.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

Radioprotection — Critères de performance pour les laboratoires utilisant l'analyse des translocations visualisées par hybridation in situ fluorescente (FISH) pour évaluer l'exposition aux rayonnements ionisants

1 Domaine d'application

L'objectif du présent document est de fournir des critères pour l'assurance de la qualité (AQ), le contrôle de la qualité (CQ) et l'évaluation des performances des laboratoires de service pratiquant la dosimétrie biologique par cytogénétique.

Le présent document aborde:

a) les responsabilités du demandeur et du laboratoire;

b) la confidentialité des informations personnelles pour le demandeur et le laboratoire;

c) les exigences de sécurité du laboratoire;

d) le traitement des échantillons, la culture, la coloration et le dénombrement, y compris les critères de dénombrement pour l'analyse des translocations par FISH;

e) les sources de calibration et les gammes de doses de calibration utiles pour établir les courbes dose-effet de référence qui contribuent à l'estimation dosimétrique à partir de la fréquence des aberrations chromosomiques et la limite de détection;

f) la procédure de dénombrement des translocations colorées par FISH utilisée pour l'évaluation de l'exposition;

g) les critères pour convertir une fréquence mesurée d'aberrations en une estimation de dose absorbée (également dénommée «estimation dosimétrique»);

h) la présentation des résultats;

i) l'AQ et le CQ;

j) les Annexes A à F contenant des exemples d'instructions pour le traitement du prélèvement par le demandeur, de questionnaire, de tableau type pour le dénombrement des aberrations chromosomiques, de rapport et d'ajustement de la courbe dose-effet par la méthode du maximum de vraisemblance et de calcul de l'incertitude sur l'estimation de la dose absorbée.

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: disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp

© ISO 2019 – Tous droits réservés

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse https://www.electropedia.org/

3.1
dose absorbée
D
quantité d'énergie de rayonnement ionisant impartie par unité de masse d'un matériau spécifié

3.2
acentrique
fragment chromosomique terminal ou interstitiel de taille variable, dépourvu de centromère, habituellement considéré comme un acentrique en excès lorsqu'il est formé indépendamment d'un dicentrique ou d'un anneau centrique

3.3
anticoagulant
substance chimique qui empêche le sang de coaguler

3.4
taux/fréquence de base
fréquence spontanée (ou nombre) d'aberrations chromosomiques dénombrées sur une population générale

3.5
couche leuco-plaquettaire
couche d'un échantillon de sang anticoagulé après centrifugation qui contient la plupart des globules blancs

3.6
courbe de calibration
description graphique ou mathématique de la relation effet-dose construite à partir de l'irradiation in vitro d'échantillons de sang à des doses absorbées connues

Note 1 à l'article: La courbe est utilisée pour déterminer, par interpolation, la dose de rayonnement absorbée par un individu potentiellement exposé.

3.7
centromère
région spécialisée sous forme d'une constriction d'un chromosome, qui apparaît pendant la mitose et réunit les paires chromatidiennes

3.8
chromatide
un des deux brins d'un chromosome dupliqué qui sont réunis par un seul centromère et se séparent pendant la division cellulaire pour s'individualiser comme des chromosomes

3.9
chromosome
structure porteuse de l'information génétique, constituée de pelotes d'ADN et de protéines qui se condensent pendant la division nucléaire pour former des éléments de forme caractéristique

3.10
aberration chromosomique
modification de la structure normale d'un chromosome impliquant le même locus sur les deux chromatides d'un même chromosome observé en métaphase

3.11
colcémide
composé alcaloïde qui inhibe la formation du fuseau pendant la division cellulaire

Note 1 à l'article: Il est utilisé pour collecter un grand nombre de cellules en métaphase en les empêchant de progresser en anaphase.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

3.12
aberration complexe
aberration impliquant trois cassures ou plus dans au moins deux chromosomes et induite de manière caractéristique après une exposition à un rayonnement ionisant dense ou à des doses élevées de rayonnement à faible densité d'ionisation

3.13
intervalle de confiance
plage dans laquelle se situe la vraie valeur d'une grandeur statistique avec une probabilité spécifiée

3.14
covariance
mesure de la corrélation de la variance entre (au moins) deux ensembles de données ou paramètres dépendants

3.15
seuil de décision
valeur de l'estimateur du mesurande telle que, quand le résultat du mesurage réel utilisant une procédure de mesure donnée d'un mesurande quantifiant le phénomène physique lui est supérieur, on décide que le phénomène physique est présent

Note 1 à l'article: Le seuil de décision est défini de manière que, dans le cas où le résultat du mesurage, y, dépasse le seuil de décision, y^*, la probabilité que la valeur vraie du mesurande soit nulle est inférieure ou égale à la probabilité choisie, α.

Note 2 à l'article: Si le résultat, y, est inférieur au seuil de décision, y^*, le résultat ne peut pas être attribué à l'effet physique, mais il ne peut pas être conclu qu'il est absent.

3.16
limite de détection
plus petite valeur vraie du mesurande qui garantit une probabilité spécifiée qui soit détectable par la procédure de mesure

Note 1 à l'article: Avec le *seuil de décision* (3.15), la limite de détection est la plus petite valeur vraie du mesurande pour laquelle la probabilité de décider de façon erronée que la valeur vraie du mesurande est nulle est égale à une valeur spécifiée, β, quand, en réalité, la valeur vraie du mesurande n'est pas nulle.

3.17
dicentrique
chromosome aberrant portant deux centromères résultant de la jonction des morceaux de deux chromosomes coupés (généralement accompagné d'un fragment acentrique)

3.18
hybridation in situ fluorescente
FISH
technique utilisant des séquences spécifiques d'ADN comme sondes de régions particulières du génome, permettant de surligner ou «peindre» des régions chromosomiques en différentes couleurs par la fixation de divers fluorochromes

3.19
fluorochrome
molécules fluorescentes lorsqu'elles sont excitées de manière appropriée

Note 1 à l'article: Les fluorochromes sont utilisés pour la cytogénétique FISH pour mettre en évidence des régions chromosomiques spécifiques.

3.20
équivalent génome
fréquence de translocations qui seraient observées si tous les chromosomes étaient peints, calculé à partir du nombre de translocations détectées sur un nombre limité de chromosomes peints

© ISO 2019 – Tous droits réservés

3.21
insertion
réarrangement de chromosomes dans lequel un morceau de chromosome a été inséré dans un autre chromosome

3.22
interphase
période d'un cycle cellulaire entre deux divisions mitotiques

3.23
transfert linéique d'énergie
TLE
énergie de rayonnement déposée par unité de longueur de trajectoire parcourue à travers un matériau biologique

3.24
métaphase
étape de la mitose au cours de laquelle la membrane nucléaire est dissoute, les chromosomes condensés au maximum et alignés pour la division

3.25
protocole portant sur l'identification des aberrations et sur la terminologie associée à leur classification
PAINT
terminologie utilisée dans l'analyse FISH pour décrire les aberrations chromosomiques

3.26
fidélité
concept utilisé pour décrire la dispersion des mesures par rapport à une valeur moyenne ou une tendance centrale

3.27
essai d'aptitude
évaluation de la performance d'un participant par rapport à des critères préétablis au moyen de comparaisons interlaboratoires

3.28
assurance de la qualité
AQ
actions planifiées et systématiques nécessaires pour attester qu'un processus, un mesurage ou un service satisfait aux exigences de qualité définies

3.29
contrôle de la qualité
CQ
partie de l'assurance de la qualité qui a pour objectif de vérifier que les systèmes et les composants sont en conformité avec les exigences prédéfinies

3.30
translocation radio-induite
parmi les translocations observées, celles qui peuvent être attribuées à une irradiation, ce qui exclut donc les translocations induites par d'autres sources (par exemple l'âge, les facteurs liés au mode de vie)

3.31
anneau
chromosome circulaire aberrant résultant de la jonction de deux points de cassure d'un même chromosome

Note 1 à l'article: Les anneaux peuvent être centriques ou acentriques.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

3.32
laboratoire de service
laboratoire pratiquant des expertises par dosimétrie biologique

3.33
aberration stable
aberration qui ne conduit pas à la mort de la cellule et qui peut être transmise aux cellules filles (par exemple, simple translocation)

3.34
cellule stable
cellule sans aberrations instables, qui peut être entièrement intacte ou contenir uniquement des aberrations de type stable et qui peut survivre à une division

3.35
translocation
aberration chromosomique stable dans laquelle des parties d'au moins deux chromosomes sont échangées

3.36
aberration instable
aberration qui peut conduire à la mort de la cellule (par exemple, dicentriques/anneaux centriques/fragments acentriques)

4 Analyse des translocations par FISH

4.1 Généralités

La fréquence des aberrations chromosomiques observées en métaphase dans les lymphocytes du sang périphérique humain en culture est utilisée pour estimer la dose absorbée après une suspicion d'exposition aux rayonnements ionisants. Le présent document se concentre sur l'évaluation rétrospective des expositions survenues par le passé ou des expositions prolongées pour lesquelles le dénombrement des dicentriques (voir ISO 19238) et l'essai de micronoyaux avec blocage de la cytodiérèse (voir ISO 17099) ne sont pas applicables en raison de la diminution de ce type de dommages au fil du temps. Les aberrations à utiliser sont les translocations et les insertions dans des cellules stables. Pour l'application du présent document, le laboratoire de service doit choisir le type d'aberrations à analyser dans l'objectif de fournir des estimations de doses absorbées. Il doit être cohérent tout au long de l'analyse.

Il est bien établi que les fréquences de translocation de base chez les individus varient en fonction de l'âge en raison de différents facteurs confondants (à savoir l'état nutritionnel, les expositions génotoxiques, les facteurs liés au mode de vie, la mauvaise ségrégation des chromosomes sexuels). Il s'agit d'une information clé à prendre en compte pour les estimations de doses absorbées à l'aide d'une analyse des translocations.

Les aberrations chromosomiques sont ci-après désignées «translocations», mais peuvent inclure des insertions si le laboratoire de service le décide.

4.2 Culture et fixation

De la même manière que dans l'ISO 19238, les lymphocytes sont cultivés par une méthode qui maximise les métaphases de première division. Cette méthode nécessite du sang total ou des lymphocytes isolés des autres éléments du sang, incubés dans un milieu de culture contenant un mitogène qui stimule le cycle de mitose des lymphocytes. Pour l'analyse des translocations, un contrôle du cycle cellulaire est recommandé. Un agent mitotique, la colcémide, est ajouté pour arrêter la division des lymphocytes en métaphase et ainsi les prélever. La durée de la culture et la période d'incubation avec l'agent bloquant sont optimisées pour assurer un index mitotique adéquat.

© ISO 2019 – Tous droits réservés