

NORME
INTERNATIONALE

ISO
19040-1

Première édition
2018-08

**Qualité de l'eau — Détermination du
potentiel œstrogénique de l'eau et des
eaux résiduaires —**

**Partie 1:
Essai d'œstrogénicité sur levures
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

*Water quality — Determination of the estrogenic potential of water
and waste water —*

*Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*)*

ISO 19040-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ea88444-b3bd-4dd1-bbdf-ca0e7408ccda/iso-19040-1-2018>



Numéro de référence
ISO 19040-1:2018(F)

© ISO 2018

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19040-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ea88444-b3bd-4dd1-bbdf-ca0e7408ccda/iso-19040-1-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

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
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	4
5 Interférences	4
6 Appareillage et matériel	5
7 Réactifs, milieux et souche d'essai	6
8 Échantillonnage et échantillons	10
8.1 Généralités	10
8.2 Flacons et matériel d'échantillonnage	10
8.3 Nettoyage préalable des flacons et du matériel	11
8.4 Mode opératoire d'échantillonnage	11
8.5 Transport des échantillons	11
8.6 Prétraitement des échantillons	11
8.7 Conservation des échantillons	12
9 Mode opératoire	12
9.1 Préparation de cryo-cultures pour une conservation à long terme	12
9.2 Culture d'une nuit	12
9.3 Configuration d'essai pour des échantillons aqueux	13
9.3.1 Préparation	13
9.3.2 Préparation de la gamme de dilution de référence	13
9.3.3 Témoin négatif	14
9.3.4 Réplicat à blanc	14
9.3.5 Dilution de l'échantillon	14
9.3.6 Blanc de terrain	14
9.3.7 Préparation de la plaque	15
9.3.8 Inoculation de la plaque d'essai	15
9.4 Mesurage	16
9.4.1 Mesurage de la densité cellulaire	16
9.4.2 Mesurage de l'activité du gène rapporteur	16
9.5 Calcul de l'absorbance corrigée et de l'induction du gène rapporteur	17
9.6 Calcul de la croissance relative	18
9.7 Estimation de la EC ₅₀ du composé de référence par interpolation linéaire	18
10 Critères de validité	18
11 Critères d'évaluation	19
12 Rapport d'essai	19
Annexe A (normative) Sélection de la souche	20
Annexe B (informative) Préparation de la plaque	21
Annexe C (informative) Schéma de principe de l'essai	22
Annexe D (informative) Configuration d'essai pour les produits chimiques et les extraits	23
Annexe E (informative) Préparation d'une gamme de dilution	27
Annexe F (informative) Données de performances	28
Annexe G (informative) Utilisation d'autres souches de levure obtenues à partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Annexe H (informative) Évaluation statistique	44

Annexe I (informative) Calcul des équivalents 17β- œstradiol	46
Annexe J (informative) Mesurage de la plus faible dilution sans effet (LID) d'eaux résiduaires — Évaluation simplifiée pour les essais d'eaux résiduaires	49
Bibliographie	51

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19040-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ea88444-b3bd-4dd1-bbdf-ca0e7408ccda/iso-19040-1-2018>

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/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*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 19040 se trouve sur le site web de l'ISO.

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.

Qualité de l'eau — Détermination du potentiel œstrogénique de l'eau et des eaux résiduaires —

Partie 1: Essai d'œstrogénicité sur levures (*Saccharomyces cerevisiae*)

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il relève de la responsabilité de l'utilisateur d'établir des pratiques de santé et de sécurité appropriées.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément au présent document soient effectués par du personnel dûment formé.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode permettant de déterminer le potentiel œstrogénique de l'eau et des eaux résiduaires au moyen d'un essai avec gène rapporteur à l'aide de souches de levure génétiquement modifiées *Saccharomyces cerevisiae*. Cet essai avec gène rapporteur se fonde sur l'activation du récepteur des œstrogènes humains alpha.

Cette méthode est applicable:

- aux eaux douces;
- aux eaux résiduaires;
- aux extraits aqueux et lixiviats;
- aux éluats de sédiments (eau douce);
- aux eaux interstitielles;
- aux solutions aqueuses contenant des substances uniques ou des mélanges chimiques;
- à l'eau potable.

La limite de quantification (LDQ) de cette méthode pour l'analyse directe d'échantillons d'eau est comprise entre 8 ng/l et 15 ng/l d'équivalents 17β -œstradiol (EEQ) sur la base des résultats de l'essai interlaboratoires international (voir l'[Annexe F](#)). Le seuil supérieur de la gamme dynamique pour cet essai est compris entre 120 ng/l et 160 ng/l d'équivalent 17β -œstradiol (EEQ). Les échantillons présentant un potentiel œstrogénique supérieur à ce seuil doivent être dilués pour une quantification valable. L'extraction et la préconcentration des échantillons d'eau peuvent s'avérer nécessaires, si leur potentiel œstrogénique est inférieur à la LDQ donnée.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

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>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>.

3.1 réplicat à blanc

réplicat supplémentaire ne contenant pas d'organisme d'essai mais traité de la même façon que les autres réplicats d'un échantillon

[SOURCE: ISO 10872:2010, 3.5]

3.2 milieu de culture

substances nutritives se présentant sous une forme et une phase (liquide ou solidifiée) favorisant la croissance microbologique

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 24]

3.3 niveau de dilution

D

dénominateur du coefficient de dilution (le numérateur étant 1) d'un mélange d'eau ou d'eaux résiduelles et d'eau de dilution en tant que nombre entier

Note 1 à l'article: Pour de l'eau ou pour des eaux résiduelles non diluées, ce coefficient est par définition de 1→1. La valeur *D* correspondante la plus petite possible est 1. Dans le présent document, la flèche indique la transition entre le volume total initial et le volume total final.

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 28]

3.4 eau de dilution

eau ajoutée à l'échantillon soumis à essai afin de préparer une série définie de dilutions

[SOURCE: ISO 20079:2005, 3.7]

3.5 concentration efficace 50 %

EC_{50}

concentration d'un composé produisant 50 % d'un effet

Note 1 à l'article: Au sens du présent document, la EC_{50} est la concentration d'un composé qui induit 50 % de l'activité maximale du gène rapporteur qui peut être atteinte par ce composé.

3.6 blanc de terrain

réipient préparé dans le laboratoire, utilisant comme réactif de l'eau ou toute autre matrice de blanc, et destiné à être emporté par le personnel d'échantillonnage pour être exposé à l'environnement dans lequel l'échantillonnage est effectué afin de vérifier l'absence de contamination au cours de l'échantillonnage

[SOURCE: ISO 11074:2015, 4.5.3]

3.7**taux d'induction**

rapport du signal moyen mesuré après l'exposition à une dose de l'échantillon pour essai ou à un témoin positif et du signal moyen mesuré pour le témoin négatif dans les mêmes conditions expérimentales

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiée — «absorbance corrigée» remplace «colonies mutantes»; «puits» remplace «plaques correspondantes», «rapport» remplace «différence».]

3.8**inoculum**

fraction d'une culture de micro-organismes utilisée pour démarrer une nouvelle culture ou une préculture à croissance exponentielle dans un nouveau milieu de culture

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 44]

3.9**limite de quantification****LDQ**

valeur la plus faible d'une caractéristique à déterminer pouvant être mesurée avec un niveau acceptable d'exactitude et de fidélité

[SOURCE: ISO 15839:2003, 3.18]

3.10**plus faible dilution sans effet****LID**

plus faible dilution dans un lot d'essai qui ne présente aucun effet, c'est-à-dire aucune augmentation statistiquement significative de l'activité du gène rapporteur par rapport au témoin négatif

[SOURCE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiée — «augmentation de l'activité du gène rapporteur» remplace «augmentation du nombre de puits de révertants».]

3.11**témoin négatif**

eau de dilution sans l'échantillon pour essai

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 51]

3.12**culture d'une nuit**

culture commencée en fin d'après-midi et dont l'incubation dure toute une nuit, afin qu'elle puisse être utilisée le matin suivant à des fins, par exemple, d'inoculation d'une préculture

Note 1 à l'article: La procédure de réalisation d'une culture d'une nuit est décrite en [9.2](#).

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 54, modifiée — suppression de: «généralement environ 16 h».]

3.13**composé de référence**

composé avec une ou plusieurs valeurs de propriété suffisamment reproductibles et bien établies pour permettre l'étalonnage de la méthode de mesure

[SOURCE: ISO 7405:2008, 3.6, modifiée — «composé» remplace «produit»; «l'étalonnage de la méthode de mesure» remplace «l'utilisation du produit ou de la substance pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesure, ou pour l'attribution de valeurs à des produits».]

3.14**activité du gène rapporteur**

activité quantitative d'un gène fixé au promoteur d'un autre gène

3.15

culture mère

culture d'une souche d'organismes maintenue dans certaines conditions afin de conserver ses caractéristiques d'origine, telles que les séquences des nucléotides

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 87]

3.16

échantillon pour essai

portion non diluée, diluée ou préparée autrement d'un échantillon soumis à l'essai, après exécution de toutes les étapes de préparation, telles que la centrifugation, la filtration, l'homogénéisation, l'ajustement du pH et la détermination de la force ionique

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 92]

4 Principe

L'essai d'œstrogénicité sur levures (YES) est un essai avec gène rapporteur qui peut être utilisé pour mesurer l'activation du récepteur alpha des œstrogènes humains (hER α) en présence d'un échantillon contenant des composés qui activent le récepteur des œstrogènes (ER).

Ainsi, le dosage détecte l'activité œstrogénique de l'ensemble de l'échantillon dans son état réel comme une mesure intégratrice incluant les effets additifs, synergique et antagoniste possibles du mélange sur l'ensemble du processus d'expression du gène rapporteur.

Le principe fondamental de ces essais est expliqué dans les Références [10] et [11]. Le récepteur hER α s'exprime de façon hétérologue dans la cellule de levure sous le contrôle d'un promoteur induit par le cuivre. Le récepteur des œstrogènes appartient à la famille des récepteurs nucléaires d'hormones. Lorsque des agonistes du récepteur des œstrogènes pénètrent dans la cellule de levure, ils se lient à la protéine réceptrice des œstrogènes et induisent ainsi son changement conformationnel. En conséquence, deux protéines réceptrices forment un dimère récepteur qui est transloquée vers le noyau. Cette activation du récepteur des œstrogènes est mesurée par l'induction du gène rapporteur *lacZ* qui code l'enzyme β -galactosidase. Le gène *lacZ* est fusionné avec un promoteur contenant des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) et est ainsi contrôlé par l'activité du récepteur d'œstrogènes. L'ER dimère se lie au promoteur et active ainsi l'expression et la sécrétion de la β -galactosidase. Enfin, l'activité de la β -galactosidase en tant que mesure du potentiel œstrogénique de l'échantillon est déterminée en utilisant un substrat approprié dont le clivage génère un produit de réaction coloré. Le produit de réaction peut être mesuré par photométrie. Voir l'[Annexe C](#) pour un schéma du principe de l'essai.

5 Interférences

Les échantillons colorés ou troubles peuvent interférer avec la détection photométrique de la densité cellulaire et/ou la détection du produit de réaction de l'enzyme rapportrice β -galactosidase (voir [l'Article 10](#) pour de plus amples informations).

Les effets toxiques de l'échantillon pour essai peuvent entraîner une réduction des cellules viables et une réduction du signal mesurable. En conséquence, les effets œstrogéniques d'un échantillon peuvent être masqués par des effets toxiques aigus et conduire à des résultats d'essai faux négatifs (voir [Article 10](#) pour de plus amples informations).

Une salinité élevée peut provoquer des effets toxiques dus à la pression osmotique résultante. La conductivité de l'échantillon est une mesure de sa salinité. La souche de levure construite par McDonnell et al. (Référence [10]) tolère une conductivité de l'échantillon pouvant aller jusqu'à 34 000 μ S/cm.

La croissance bactérienne dans les puits d'essai est évaluée par le réplicat à blanc (3.1). Voir [l'Article 10](#) pour de plus amples informations.

Lorsque des échantillons filtrés sont soumis à essai afin d'éliminer les bactéries de l'échantillon, des particules solides sont également séparées de l'échantillon. Ainsi, les substances ayant une activité œstrogénique qui sont adsorbées sur les particules peuvent ne pas être détectées.

Cet essai ayant une haute sensibilité, il faut éviter toute contamination du tampon, des milieux et de l'ensemble des réactifs utilisés par des composés ayant une activité œstrogénique pour éviter d'avoir des résultats d'essai faux positifs.

6 Appareillage et matériel

Pour des dispositifs d'échantillonnage appropriés, voir [l'Article 8](#). Le matériel et la verrerie de laboratoire courants sont nécessaires. En particulier, le matériel suivant est nécessaire:

- 6.1 **Incubateur agitateur**, avec minuteur et régulation de température, 30 °C ± 1 °C et 37 °C ± 1 °C.
- 6.2 **pH-mètre**.
- 6.3 **Stérilisateur à vapeur**.
- 6.4 **Stérilisateur à sec**.
- 6.5 **Centrifugeuse**, avec un rotor pour tubes de 15 ml et 50 ml jusqu'à 2 500 *g* et un rotor pour plaques à 96 puits jusqu'à 2 500 *g*.
- 6.6 **Agitateur vortex**.
- 6.7 **Congélateur**, au moins ≤ -18 °C et ≤ -70 °C.
- 6.8 **Filtre stérile**, en acétate de cellulose, diamètre des pores 0,2 µm.
- 6.9 **Anses d'ensemencement**.
- 6.10 **Pipette multicanaux pour usage à répétition (pipette «multistepper»)**.
- 6.11 **Pipettes multicanaux**, pouvant distribuer de 5 µl à 50 µl et de 50 µl à 300 µl.
- 6.12 **Spectrophotomètre**.
- 6.13 **Plaques à 96 puits en polystyrène transparent stériles**, à fond plat pour culture de suspensions, et couvercle.
- 6.14 **Photomètre pour microplaques à 96 puits**, pour mesurage de l'absorbance à 540 nm ± 20 nm ou à 580 nm ± 20 nm, et à 600 nm ± 20 nm.
- 6.15 **Paillasse propre**.
- 6.16 **Boîtes de Petri**, d'environ 94 mm de diamètre et d'environ 16 mm de hauteur.
- 6.17 **Flacons cryogéniques**, stériles, 1 ml, 10 ml.
- 6.18 **Gants en nitrile à usage unique**.

6.19 Membrane d'étanchéité perméable à l'air pour plaques à 96 puits.

7 Réactifs, milieux et souche d'essai

7.1 Réactifs

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

7.1.1 Base azotée pour levure sans acides aminés¹⁾.

7.1.2 α -D-Glucose, anhydre, $C_6H_{12}O_6$, masse moléculaire 180,15 g/mol, CAS: 50-99-7.

7.1.3 Adénine, $C_5H_5N_5$, masse moléculaire 135,13 g/mol, CAS: 73-24-5.

7.1.4 L-arginine, $C_6H_{14}N_4O_2$, masse moléculaire 174,20 g/mol, CAS: 74-79-3.

7.1.5 ACIDE L-aspartique, $C_4H_7NO_4$, masse moléculaire 133,10 g/mol, CAS: 56-84-8.

7.1.6 SEL MONOSODIQUE D'ACIDE L-glutamique monohydraté, $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$, masse moléculaire (anhydre) 169,11 g/mol, CAS: 142-47-2 (sel anhydre).

7.1.7 L-histidine-HCl, $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl$, H_2O , masse moléculaire 209,6 g/mol, CAS: 5934-29-2.

7.1.8 L-isoleucine, $C_6H_{13}NO_2$, masse moléculaire 131,17 g/mol, CAS: 73-32-5.

7.1.9 L-leucine, $C_6H_{13}NO_2$, masse moléculaire 131,17 g/mol, CAS: 61-90-5.

7.1.10 L-lysine-HCl, $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$, masse moléculaire 182,65 g/mol, CAS: 657-27-2.

7.1.11 L-méthionine, $C_5H_{11}NO_2S$, masse moléculaire 149,21 g/mol, CAS: 63-68-3.

7.1.12 L-phénylalanine, $C_9H_{11}NO_2$, masse moléculaire 165,19 g/mol, CAS: 63-91-2.

7.1.13 L-sérine, $C_3H_7NO_3$, masse moléculaire 105,09 g/mol, CAS: 56-45-1.

7.1.14 L-thréonine, $C_4H_9NO_3$, masse moléculaire 119,12 g/mol, CAS: 72-19-5.

7.1.15 L-tyrosine, $C_9H_{11}NO_3$, masse moléculaire 181,19 g/mol, CAS: 60-18-4.

7.1.16 L-valine, $C_5H_{11}NO_2$, masse moléculaire 117,15 g/mol, CAS: 72-18-4.

7.1.17 Sulfate de cuivre(II) pentahydraté, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, masse moléculaire 249,69 g/mol, CAS: 7758-99-8.

7.1.18 Sel sodique d'ampicilline, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, masse moléculaire 371,39 g/mol, CAS: 69-52-3.

1) Une base azotée pour levures sans acides aminés contient une source d'azote telle que le sulfate d'ammonium, des vitamines et des éléments à l'état de traces qui sont nécessaires pour la croissance des cellules de levure. Une base azotée pour levures est utilisée afin de sélectionner les souches de levure en fonction des exigences en matière de sources de carbone et d'acides aminés.

7.1.19 Sel de sulfate de streptomycine, $C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1,5H_2SO_4$, masse moléculaire 728,69 g/mol, CAS: 3810-74-0.

7.1.20 Gélose pour microbiologie, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$, CAS: 9002-18-0.

7.1.21 Solution d'acide chlorhydrique, 1 M (HCl), masse moléculaire 36,46 g/mol, CAS: 7647-01-0.

7.1.22 Hydroxyde de sodium, NaOH, masse moléculaire 40,00 g/mol, CAS: 1310-73-2.

7.1.23 Éthanol, $\geq 99,8 \%$, CH_3CH_2OH , masse moléculaire 46,07 g/mol, CAS: 64-17-5.

7.1.24 Glycérol pour biologie moléculaire, $\geq 99 \%$, $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$, masse moléculaire 92,09 g/mol, CAS: 56-81-5.

7.1.25 17 β -œstradiol, $\geq 98 \%$, $C_{18}H_{24}O_2$, masse moléculaire 272,38 g/mol, CAS: 50-28-2.

7.1.26 Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, masse moléculaire 177,99 g/mol, CAS: 10028-24-7.

7.1.27 Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, masse moléculaire 137,99 g/mol, CAS: 10049-21-5.

7.1.28 Chlorure de potassium, KCl, masse moléculaire 74,55 g/mol, CAS: 7447-40-7.

7.1.29 Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, masse moléculaire 246,47 g/mol, CAS: 10034-99-8.

7.1.30 Rouge de chlorophénol- β -D-galactopyranoside (CPRG), $C_{25}H_{22}Cl_2O_{10}S$, masse moléculaire 585,41 g/mol, CAS: 99792-79-7.

7.1.31 Lyticase d'*Arthrobacter luteus* en poudre lyophilisée, $\geq 2\ 000$ unités/mg de protéine, CAS: 37340-57-1.

7.1.32 DL-dithiothréitol, $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$, masse moléculaire 154,25 g/mol, CAS: 3483-12-3.

7.1.33 Dodécylsulfate de sodium, $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, masse moléculaire 288,38 g/mol, CAS: 151-21-3.

7.1.34 Acétone (pureté «pour analyses»), CH_3COCH_3 , masse moléculaire 58,08 g/mol, CAS: 67-64-1.

7.2 Eau, qualité 3, telle que définie dans l'ISO 3696; une eau dont la conductivité est inférieure ou égale à 5 μ S/cm est acceptable.

Lorsqu'une eau stérile est nécessaire, la stériliser à l'autoclave ou par filtration (acétate de cellulose, 0,2 μ m). L'eau telle que spécifiée ici est également utilisée pour la dilution progressive de l'échantillon pour essai.

7.3 Souche d'essai.

La production de cette souche d'essai est expliquée dans les Références [10] et [11]. Elle est dérivée de la souche *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 (pauvre en protéase, MAT α , PEP4::HIS3, prb-1-delta1.6R, HIS3-delta200, lys2-801, trp1-delta101, ura3-52gal2can1). Cette souche comporte deux plasmides. La construction de ces plasmides est décrite dans la Référence [10]. Le plasmide YEPE10 contient

la fusion *CUP1::hER* qui code le récepteur des œstrogènes humains α -cloné de la lignée cellulaire humaine MCF-7 sous le contrôle du promoteur de métallothionéine *CUP1*. Ce plasmide est sélectionné via l'auxotrophie pour le tryptophane de la souche mère. Le deuxième plasmide est le plasmide rapporteur YRPEG3 qui contient le gène chimère *2ERE-CyC1::lacZ*. Ce gène chimère exprime la β -galactosidase (codée par *lacZ*) sous le contrôle du promoteur d'iso1cytochrome c de *S. cerevisiae* qui fusionne avec deux copies du gène de vitellogénine A2 de *Xenopus laevis*. Ce plasmide est sélectionné via l'auxotrophie pour l'uracile de la souche mère.

7.4 Milieu.

Si nécessaire, passer les milieux à l'autoclave pendant 20 min à $121\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Couvrir légèrement les récipients (par exemple, avec une feuille d'aluminium). Ne jamais fermer hermétiquement.

7.4.1 milieu SD 10x.

Dissoudre 67,0 g de base azotée pour levures sans acides aminés (7.1.1) et 200 g de glucose (7.1.2) dans de l'eau (7.2) et compléter à 1 l avec de l'eau (7.2). Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 μm). Ne pas passer la solution à l'autoclave car elle contient des vitamines telles que la biotine. Conserver la solution, par aliquotes de 50 ml, à l'abri de la lumière à $\leq -18\text{ °C}$, la durée de conservation ne devant pas dépasser 12 mois.

7.4.2 Milieu DO-McD (McDonnell) 10x.

Dissoudre

- 175 mg de L-lysine-HCl (7.1.10);
- 120 mg de L-histidine-HCl (7.1.7);

dans de l'eau (7.2) et compléter à 500 ml avec de l'eau (7.2).

Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 μm) et la conserver, par aliquotes de 40 ml, à l'abri de la lumière à $\leq -18\text{ °C}$, la durée de conservation ne devant pas dépasser 6 mois.

7.4.3 Solution de glucose.

Dissoudre

- 144 g de α -D-glucose (7.1.2)

dans de l'eau (7.2) et compléter à 500 ml avec de l'eau (7.2).

Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 μm) ou la passer à l'autoclave et la conserver à l'abri de la lumière à une température comprise entre 2 °C et 8 °C , la durée de conservation ne devant pas dépasser 12 mois.

7.4.4 Solution de CuSO_4 , 10 mmol/l.

Dissoudre 250 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7.1.17) dans de l'eau (7.2) et compléter à 100 ml avec de l'eau (7.2).

Passer la solution à l'autoclave. La solution peut être conservée à température ambiante et utilisée dans les 12 mois suivant sa préparation.

7.4.5 Solution mère d'ampicilline.

Dissoudre 1 g de sel sodique d'ampicilline (7.1.18) dans de l'eau (7.2) et compléter à 10 ml avec de l'eau (7.2).

Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 μm) et la conserver, par aliquotes de 1 ml, à l'abri de la lumière à $\leq -18\text{ °C}$, la durée de conservation ne devant pas dépasser 12 mois.

7.4.6 Solution mère de streptomycine.

Dissoudre 1 g de sel de sulfate de streptomycine (7.1.19) dans de l'eau (7.2) et compléter à 10 ml avec de l'eau (7.2).

Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 µm) et la conserver, par aliquotes de 1 ml, à l'abri de la lumière à ≤ -18 °C, la durée de conservation ne devant pas dépasser 12 mois.

7.4.7 Milieu de croissance (McDonnell).

Ajouter

- 10 ml de milieu SD 10x (7.4.1);
- 10 ml de milieu DO-McD 10x (McDonnell, 7.4.2);

dans 80 ml d'eau stérile (7.2) dans des conditions stériles. Diviser le milieu en aliquotes de 20 ml. Conserver le milieu à l'abri de la lumière soit à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, auquel cas la durée de conservation ne doit pas dépasser 1 semaine, soit à une température ≤ -18 °C, auquel cas la durée de conservation ne doit pas dépasser 6 mois.

7.4.8 Milieu d'exposition (McDonnell).

Mélanger

- 4,2 ml milieu SD 10x (7.4.1);
- 4,2 ml milieu DO-McD (McDonnell) 10x (7.4.2);
- 1,6 ml solution de glucose (7.4.3);
- 99 µl solution de CuSO₄ (7.4.4);
- 67 µl solution mère d'ampicilline (7.4.5);
- 67 µl solution mère de streptomycine (7.4.6).

Préparer le milieu d'exposition juste avant de l'utiliser. Il faut 5 ml de milieu d'exposition par plaque de 96 puits.

7.4.9 Solution aqueuse d'éthanol, fraction volumique de 0,3 %.

Ajouter de l'eau (7.2) stérile à 300 µl d'éthanol (7.1.23) de sorte à obtenir un volume final de 100 ml.

7.4.10 Solution aqueuse de glycérol, fraction volumique de 30 %.

Ajouter de l'eau (7.2) à 3 ml de glycérol (7.1.24) de sorte à obtenir un volume final de 10 ml. Stériliser la solution par filtration (acétate de cellulose, 0,2 µm) ou la passer à l'autoclave.

7.4.11 Solution mère de 17β-œstradiol (E2).

Dissoudre 50 mg de 17β-œstradiol (E2) (7.1.25) dans de l'éthanol (7.1.23) et compléter à 10 ml avec de l'éthanol (7.1.23). Conserver la solution mère, par aliquotes de 1 ml, à l'abri de la lumière à ≤ -18 °C, la durée de conservation ne devant pas dépasser 12 mois.

7.4.12 Tampon lacZ.

Dissoudre dans 950 ml d'eau (7.2):

- 10,67 g Na₂HPO₄·2H₂O (7.1.26);