

NORME ISO  
INTERNATIONALE 19040-2

Première édition  
2018-08

---

---

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

**Partie 2:  
Test d'œstrogénicité (A-YES, *Arxula  
adeninivorans*)**

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

*Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, *Arxula adeninivorans*)*

ISO 19040-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ef13823-4086-4a56-86cf-334e1492bbb7/iso-19040-2-2018>



Numéro de référence  
ISO 19040-2:2018(F)

© ISO 2018

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 19040-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ef13823-4086-4a56-86cf-334c1492bbb7/iso-19040-2-2018>



**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](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>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>4</b>
<b>5</b> <b>Interférences</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b> <b>Appareillage et matériel</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b> <b>Réactifs, milieux et souches d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>8</b> <b>Échantillonnage et échantillons</b> .....	<b>10</b>
8.1    Généralités .....	10
8.2    Flacons et matériel d'échantillonnage .....	10
8.3    Nettoyage préalable des flacons et du matériel .....	10
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
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>12</b>
9.1    Configuration d'essai .....	12
9.1.1    Préparation de la gamme de dilution de référence .....	12
9.1.2    Réactivation de la levure .....	12
9.1.3    Témoin négatif .....	13
9.1.4    Réplicat à blanc .....	13
9.1.5    Dilution de l'échantillon .....	14
9.1.6    Blanc de terrain .....	14
9.1.7    Préparation de la plaque .....	14
9.1.8    Inoculation de la plaque d'essai .....	15
9.2    Mesurage .....	16
9.2.1    Mesurage de l'activité du gène rapporteur .....	16
9.2.2    Mesurage de la densité cellulaire .....	16
9.3    Calculs .....	17
9.3.1    Correction du bruit de fond .....	17
9.3.2    Calcul de la croissance relative .....	18
9.3.3    Calculs pour l'évaluation des blancs d'échantillon .....	18
9.3.4    Calcul de l'induction du gène rapporteur .....	20
<b>10</b> <b>Critères de validité</b> .....	<b>23</b>
<b>11</b> <b>Critères d'évaluation</b> .....	<b>24</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>24</b>
<b>13</b> <b>Vérification</b> .....	<b>25</b>
<b>Annexe A (informative) Préparation de la plaque</b> .....	<b>26</b>
<b>Annexe B (informative) Lyophilisation des cellules d'<i>Arxula adenivorans</i></b> .....	<b>27</b>
<b>Annexe C (informative) Schéma de principe de l'essai</b> .....	<b>29</b>
<b>Annexe D (informative) Configuration d'essai pour les produits chimiques et les extraits</b> .....	<b>30</b>
<b>Annexe E (informative) Préparation d'une gamme de dilution</b> .....	<b>31</b>
<b>Annexe F (informative) Données de performances</b> .....	<b>32</b>
<b>Annexe G (informative) Évaluation statistique</b> .....	<b>43</b>

<b>Annexe H</b> (informative) <b>Calcul des équivalents œstradiol</b> .....	<b>44</b>
<b>Annexe I</b> (informative) <b>Autre conception d'essai pour la détermination de EEQ</b> .....	<b>47</b>
<b>Annexe J</b> (informative) <b>Mesurage de la plus faible dilution sans effet (LID) d'eaux résiduaires — Évaluation simplifiée pour les essais d'eaux résiduaires</b> .....	<b>48</b>
<b>Annexe K</b> (informative) <b>Exemple d'évaluation statistique</b> .....	<b>50</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>57</b>

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

[ISO 19040-2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ef13823-4086-4a56-86cf-334c1492bbb7/iso-19040-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ef13823-4086-4a56-86cf-334c1492bbb7/iso-19040-2-2018>

## 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](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

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

Pour une explication de la 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.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

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](http://www.iso.org/fr/members.html).



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

## Partie 2:

### Test d'œstrogénicité (A-YES, *Arxula adenivorans*)

**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 un gène rapporteur à l'aide d'une souche de levure génétiquement modifiée *Arxula adenivorans*. Cet essai avec gène rapporteur se fonde sur l'activation du récepteur des œstrogènes humains alpha. L'essai détecte la fraction du potentiel œstrogénique ou de l'œstrogénicité d'un échantillon qui est induite par les molécules interagissant avec le récepteur; il ne répond pas aux molécules ayant des modes d'action qui ne passent pas directement par le récepteur comme les modulateurs de la stéroïdogénèse, du transport ou de la clairance des stéroïdes sexuels.

L'essai A-YES (essai d'œstrogénicité sur levure *Arxula*) est un essai avec gène rapporteur qui peut être utilisé pour mesurer l'activation du récepteur alpha des œstrogènes humains ( $ER\alpha$ ) en présence d'un échantillon contenant des composés qui provoquent des effets œstrogéniques en interagissant avec le récepteur. Ainsi, le dosage détecte l'activité œstrogénique de l'ensemble de l'échantillon dans son état réel comme une mesure intégrale incluant les effets additifs, synergique et antagoniste possibles du mélange sur le récepteur des œstrogènes humains.

*Arxula adenivorans* est un organisme d'essai très robuste, résistant au sel et à la température qui est particulièrement adapté à l'analyse d'échantillons ayant une salinité élevée (conductivité jusqu'à 70 mS/cm). L'organisme d'essai peut être cultivé dans un milieu contenant jusqu'à 20 % de chlorure de sodium.

Cette méthode est applicable:

- aux eaux douces;
- aux eaux résiduaires;
- à l'eau de mer;
- à l'eau saumâtre;
- 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 1,5 ng/l et 3 ng/l d'équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ). Le seuil supérieur de la gamme dynamique pour cet essai est compris entre 25 ng/l et 40 ng/l d'équivalent 17 $\beta$ -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.

Un essai interlaboratoires international a été réalisé pour la validation du présent document. L'[Annexe F](#) fournit un récapitulatif des résultats.

NOTE L'extraction et la préconcentration des échantillons d'eau peuvent s'avérer nécessaires.

## 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 microbiologique

### 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 %**

CE<sub>50</sub>

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

Note 1 à l'article: Au sens du présent document, la CE<sub>50</sub> 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**

réceptacle 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 de croissance**

taux proportionnel d'augmentation de la densité cellulaire

[SOURCE: ISO 10253:2006, 3.2]

**3.8****taux d'induction**

rapport de la valeur moyenne de puits ayant une activité accrue du gène rapporteur mesurée sur les plaques traitées avec une dose de l'échantillon pour essai, à la valeur moyenne des puits correspondants traités avec le témoin négatif à l'aide de la même souche, dans des conditions identiques

Note 1 à l'article: Au lieu du témoin négatif, il est possible d'utiliser le paramètre estimé A du modèle à quatre paramètres, qui décrit la relation dose-effet entre un composé de référence et le taux d'induction.

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiée — «puits ayant une activité accrue du gène rapporteur mesurée» remplace «colonies mutantes dénombrées»; «puits correspondants» remplace «plaques correspondantes»; «rapport» remplace «différence».]

**3.9****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]

**3.10****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

#### 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 ».]

### 3.13

#### activité du gène rapporteur

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

### 3.14

#### 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 A-YES (essai d'œstrogénicité sur levure *Arxula*) est un essai avec gène rapporteur qui peut être utilisé pour mesurer l'activation du récepteur alpha des œstrogènes humains (ER $\alpha$ ) en présence d'un échantillon contenant des composés qui provoquent des effets œstrogéniques. Ainsi, le dosage détecte l'activité œstrogénique de l'ensemble de l'échantillon dans son état réel comme une mesure intégrale incluant les effets additifs, synergique et antagoniste possibles du mélange.

Le récepteur  $\alpha$  des œstrogènes humains est exprimé de façon constitutive dans la cellule de levure sous le contrôle du promoteur *TEF1*. 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. Cette activation du récepteur des œstrogènes est mesurée par l'induction du gène rapporteur *phyK* qui code l'enzyme phytase. Le gène *phyK* fusionne avec un promoteur œstrogéno-dépendant qui contient des éléments de réponse aux œstrogènes (*ERE*). L'ER dimère se lie au promoteur et active ainsi l'expression et la sécrétion de la phytase. Enfin, l'activité de la phytase 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 substrat clivé de l'enzyme rapportrice phytase (voir l'[Article 10](#) pour de plus amples informations).

Les effets de la matrice de l'échantillon peuvent entraîner une réduction ou une augmentation des cellules viables et une réduction ou une augmentation du signal mesurable. Les effets œstrogéniques d'un échantillon peuvent être masqués par les effets de matrice, conduisant ainsi à des résultats d'essai faux négatifs ou faux positifs.

Une salinité élevée peut provoquer des effets toxiques dus à la pression osmotique résultante. La conductivité d'un échantillon est une mesure de sa salinité. La levure *Arxula adenivorans* tolère une conductivité de l'échantillon jusqu'à 20 % de chlorure de sodium, ce qui correspond à une conductivité de 180 mS/cm.

La croissance bactérienne dans les puits d'essai est évaluée par le répliquat 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.

Pour des informations détaillées sur un matériel d'échantillonnage approprié qui n'influence pas le résultat d'essai, voir l'Article 8.

## 6 Appareillage et matériel

Pour des dispositifs d'échantillonnage appropriés, voir l'Article 8. Utiliser le matériel et la verrerie de laboratoire courants si nécessaire. En particulier, le matériel suivant est nécessaire:

**6.1 Incubateur agitateur avec minuteur et régulation de température**, agitateur décrivant une orbite d'au moins 3 mm, 30 °C à 37 °C avec une précision de  $\pm 1$  °C.

Si l'agitateur n'a pas de fonction d'incubation, utiliser un agitateur de laboratoire décrivant une orbite d'au moins 3 mm en combinaison avec un incubateur (6.17).

**6.2 Mini-agitateur de laboratoire.**

**6.3 Dispositif de mesurage multiparamètres pour pH et conductivité ou dispositifs séparés pour chaque paramètre.**

**6.4 Stérilisateur à vapeur.**

**6.5 Centrifugeuse**, avec un rotor pour plaques à 96 puits jusqu'à 1 000 g et un rotor pour tubes de réaction de 2 ml.

**6.6 Filtres stériles**, en acétate de cellulose, diamètre des pores 0,2  $\mu\text{m}$ .

**6.7 Pipettes à canal unique**, volume nominal de 10  $\mu\text{l}$  à 10 000  $\mu\text{l}$ .

**6.8 Pipettes à canaux multiples**, volume nominal de 100  $\mu\text{l}$  et 300  $\mu\text{l}$ .

**6.9 Plaques à 96 puits en polystyrène transparent à fond plat (profil F, 300  $\mu\text{l}$ ) et couvercle.**

**6.10 Plaques à 96 puits profonds d'un volume d'au moins 1 ml, avec puits carrés à fond rond.**

**6.11 Photomètre pour microplaques à 96 puits**, pour mesurage de l'absorbance à une longueur d'onde de 405 nm  $\pm$  20 nm et de 630 nm  $\pm$  5 nm, ou de 600 nm  $\pm$  20 nm.

**6.12 Film adhésif perméable à l'air pour plaques à puits profonds.**

**6.13 Tubes de réaction**, 2 ml.

**6.14 Tubes à essai**, 15 ml et 50 ml.

**6.15 Réservoir pour pipettes à canaux multiples.**

**6.16 Balance**, charge minimale 1 mg, d = 0,1 mg.

**6.17 Incubateur**, 30 °C à 37 °C avec une précision de ±1 °C. Pour utiliser l'incubateur en combinaison avec un agitateur, un incubateur réfrigéré est nécessaire.

**7 Réactifs, milieux et souches d'essai**

**7.1 Réactifs**

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

**7.1.1 Solution d'acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ , masse moléculaire 36,46 g/mol, CAS: 7647-01-0.

**7.1.2 Solution d'hydroxyde de sodium**,  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ , masse moléculaire 40,00 g/mol, CAS: 1310-73-2.

**7.1.3 Éthanol**, ≥ 99,8 %,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , masse moléculaire 46,07 g/mol, CAS: 64-17-5.

**7.1.4 17β-œstradiol**, ≥ 98 %,  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , masse moléculaire 272,38 g/mol, CAS: 50-28-2.

**7.1.5 Maltose monohydraté**, > 95 %,  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , masse moléculaire 360,32 g/mol, CAS: 6363-53-7.

**7.1.6 Nitrate de sodium**, > 99 %,  $\text{NaNO}_3$ , masse moléculaire 84,98 g/mol, CAS: 7631-99-4.

**7.1.7 Dihydrogénophosphate de potassium**, ≥ 99 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , masse moléculaire 136,09 g/mol, CAS: 7778-77-0.

**7.1.8 Sulfate de magnésium pur**,  $\text{MgSO}_4$ , masse moléculaire 120,37 g/mol (anhydre), CAS: 7487-88-9.

**7.1.9 Chlorure de fer(III) hexahydraté**, > 97 %,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , masse moléculaire 270,29 g/mol, CAS: 10025-77-1.

**7.1.10 Nitrate de calcium**, > 99 %,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , masse moléculaire 164,09 g/mol, CAS: 10124-37-5.

**7.1.11 D-pantothénate de calcium**, > 98 %,  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$  masse moléculaire 238,27 g/mol, CAS: 137-08-6.

**7.1.12 Chlorhydrate de thiamine**, > 98,5 %,  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$ , masse moléculaire 337,27 g/mol, CAS: 67-03-8.

**7.1.13 Niacine**, > 99,5 %,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ , masse moléculaire 123,11 g/mol, CAS: 59-67-6.

**7.1.14 Chlorhydrate de pyridoxine**, > 99 %,  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ , masse moléculaire 205,64 g/mol, CAS: 58-56-0.

**7.1.15 D-(+)-biotine**, ≥ 98,5 %,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ , masse moléculaire 244,31 g/mol, CAS: 58-85-5.

- 7.1.16 Inositol**,  $\geq 99\%$ ,  $C_6H_{12}O_6$ , masse moléculaire 180,16 g/mol, CAS: 87-89-8.
- 7.1.17 Acide borique**,  $> 99,8\%$ ,  $H_3BO_3$ , masse moléculaire 61,83 g/mol, CAS: 10043-35-3.
- 7.1.18 Sulfate de cuivre(II) pentahydraté**,  $> 99,5\%$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , masse moléculaire 249,68 g/mol, CAS: 7758-99-8.
- 7.1.19 Iodure de potassium**,  $> 99\%$ , masse moléculaire KI 166,00 g/mol, CAS: 7681-11-0.
- 7.1.20 Sulfate de manganèse monohydraté**,  $> 99\%$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , masse moléculaire 169,02 g/mol, CAS: 10034-96-5.
- 7.1.21 Sulfate de zinc heptahydraté**,  $> 99,5\%$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , masse moléculaire 287,56 g/mol, CAS: 7446-20-0.
- 7.1.22 Molybdate de sodium dihydraté**,  $> 99,5\%$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , masse moléculaire 241,95 g/mol, CAS: 10102-40-6.
- 7.1.23 Chlorure de cobalt(II) pour synthèse**,  $CoCl_2$ , masse moléculaire 129,84 g/mol, CAS: 7646-79-9.
- 7.1.24 Citrate trisodique dihydraté**,  $> 99\%$ ,  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , masse moléculaire 294,10 g/mol, CAS: 6132-04-3.
- 7.1.25 Acide citrique**,  $> 99,5\%$ ,  $C_6H_8O_7$ , masse moléculaire 192,12 g/mol, CAS: 77-92-9.
- 7.1.26 4-nitrophénylphosphate, sel disodique hexahydraté (pNPP)**,  $C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6H_2O$ , masse moléculaire 371,14 g/mol, CAS: 333338-18-4.
- 7.1.27 Hydroxyde de sodium**,  $\geq 99\%$ , NaOH, masse moléculaire 40,00 g/mol, CAS: 1310-73-2.
- 7.1.28 Eau de mer répondant aux spécifications suivantes**: chlorure (Cl) 19 290 mg/l, sodium 10 780 mg/l, sulfate 2 660 mg/l, potassium 420 mg/l, calcium 400 mg/l, carbonate (bicarbonate) 200 mg/l, strontium 8,8 mg/l, bore 5,6 mg/l, bromure 56 mg/l, iodure 0,24 mg/l, lithium 0,3 mg/l, fluorure 1,0 mg/l, magnésium (Mg) 1 320 mg/l.
- 7.1.29 Chlorure de sodium**,  $\geq 99\%$ , NaCl, masse moléculaire 58,44 g/mol, CAS: 7647-14-5.
- 7.1.30 Acétone (pureté «pour analyses »)**,  $C_3H_6O$ , 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  $\mu S/cm$  est acceptable, ou de l'eau ultrapure.

Lorsqu'une eau stérile est nécessaire, la stériliser à l'autoclave ou par filtration (acétate de cellulose, 0,2  $\mu m$ ).

L'eau telle que spécifiée ici est également utilisée pour la préparation de l'eau de dilution employée pour la dilution progressive de l'échantillon pour essai.

### 7.3 Souche d'essai

Cette souche d'essai est dérivée de *Blastobotrys adenivorans* G1214 Syn.: *Arxula adenivorans* G1214 (*aleu2 aura3::ALEU2*), Référence [1]. Cette souche est auxotrophe pour l'uracile. Pour empêcher l'apparition de résistances aux antibiotiques dans l'environnement et pour accroître l'acceptation en ce

qui concerne les exigences légales, l'organisme d'essai ne contient aucun marqueur de résistance aux antibiotiques.

Modifications génétiques: intégration du marqueur de sélection *AURA3mm* dans le plasmide Xplor2-102-hER $\alpha$ -GAA2(ERE107)-phyK après échange du promoteur *ATRP1m* du marqueur *ALEU2*. Le marqueur de sélection *AURA3mm* a été isolé du plasmide pCR4-AURA3mm-13. Les séquences de *E. coli* et de marqueur résistant à la kanamycine ont été éliminées par une digestion par enzymes de restriction. L'intégration stable de Xplor2-102-hER $\alpha$ -GAA2(ERE107)-phyK dans le génome de *Arxula adenivorans* a été obtenue par transformation de la cassette en un mutant auxotrophe pour l'uracile de *A. adenivorans* G1214 (*aleu2 aura3::ALEU2*) par recombinaison avec l'ADNr 25S.

Pour la détermination du potentiel œstrogénique des échantillons aqueux, une suspension de cellules de levure est préparée à l'aide de cellules de levure lyophilisées. Étant donné que les cellules de *Arxula adenivorans* sont lyophilisées, l'essai peut être réalisé dans des conditions hautement normalisées et aucun matériel de laboratoire spécifique n'est requis pour la culture de cellules à long terme.

Les cellules de levure sont disponibles dans le commerce. Conserver les cellules de levure lyophilisées à une température comprise entre 4 °C et 8 °C et suivre les recommandations du fabricant. Après réactivation, les cellules de levure peuvent être utilisées directement pour l'essai; une préculture n'est pas nécessaire pour les essais.

Une alternative aux cellules de levure lyophilisées disponibles dans le commerce consiste à préparer soi-même des cellules de levure lyophilisées. Le mode opératoire de préparation est décrit à l'[Annexe B](#). La souche de levure peut être isolée à partir d'un lyophilisat disponible dans le commerce.

#### 7.4 Milieu.

Lorsqu'un passage en autoclave est nécessaire, le réaliser pendant 20 min à 121 °C  $\pm$  2 °C. Couvrir légèrement les récipients (par exemple avec une feuille d'aluminium). Ne jamais fermer hermétiquement.

##### 7.4.1 Solution mère de 17 $\beta$ -œstradiol (E2).

Dissoudre 10 mg de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (7.1.4) dans 10 ml d'éthanol (7.1.3). Conserver la solution mère de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) à  $\leq$  -18 °C. Ne pas conserver la solution mère plus de 18 mois.

S'il est disponible, un étalon de référence certifié de 17 $\beta$ -œstradiol de même concentration peut être utilisé comme solution mère.

##### 7.4.2 Solution de travail de 17 $\beta$ -œstradiol (E2).

Diluer la solution mère de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (7.4.1) à 1 $\rightarrow$ 100 en ajoutant 10  $\mu$ l de la solution mère de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (7.4.1) à 990  $\mu$ l d'éthanol (7.1.3) et bien mélanger. Effectuer une dilution supplémentaire à 1 $\rightarrow$ 10 en ajoutant 100  $\mu$ l de la première dilution à 900  $\mu$ l d'éthanol (7.1.3) et bien mélanger. La concentration finale est de 1 mg/l. La solution de travail doit être préparée sous forme d'aliquote pour éviter toute congélation et décongélation de la solution de travail. Conserver la solution de travail de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) à  $\leq$  -18 °C. Ne pas conserver la solution de travail plus de 6 mois.

NOTE Le pipetage de solvants organiques nécessite l'utilisation de pipettes calibrées adéquates ou d'un autre matériel adapté à la manipulation de liquides.

##### 7.4.3 Solution de maltose.

Dissoudre 20 g de maltose monohydraté (7.1.5) dans 70 ml d'eau ultrapure (7.2). Compléter la solution de maltose à 100 ml avec de l'eau ultrapure (7.2). Passer la solution à l'autoclave. Conserver la solution de maltose à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver la solution de maltose plus de six mois.

#### 7.4.4 Solution saline pour milieu minimal pour levures.

Dissoudre 3,7 g de  $\text{NaNO}_3$  (7.1.6), 8,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7.1.7) et 1 g de  $\text{MgSO}_4$  (7.1.8) dans 70 ml d'eau ultrapure (7.2). Compléter à 100 ml avec de l'eau ultrapure (7.2). Passer la solution à l'autoclave. Conserver la solution saline pour milieu minimal pour levures à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver la solution saline plus de six mois.

#### 7.4.5 Solution saline pour milieu salin minimal pour levures.

Dissoudre 28 g de  $\text{NaCl}$  (7.1.29), 3,7 g de  $\text{NaNO}_3$  (7.1.6), 8,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7.1.7) et 1 g de  $\text{MgSO}_4$  (7.1.8) dans 70 ml d'eau ultrapure (7.2). Compléter à 100 ml avec de l'eau ultrapure (7.2). Pour l'analyse d'échantillons d'eau de mer et d'échantillons d'eau saumâtre, les 28 g de  $\text{NaCl}$  peuvent être remplacés par 28 g d'une composition saline similaire à celle de l'eau de mer. Passer la solution à l'autoclave. Conserver la solution saline pour milieu salin minimal pour levures à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant six mois au maximum.

#### 7.4.6 Solution de micronutriments.

Peser séparément les produits chimiques suivants:

0,05 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (7.1.17), 0,01 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (7.1.18), 0,01 g de  $\text{KI}$  (7.1.19), 0,04 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (7.1.20), 0,04 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7.1.21), 0,02 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7.1.22), 0,01 g de  $\text{CoCl}_2$  (7.1.23).

Mélanger les produits chimiques et les dissoudre dans 100 ml d'eau ultrapure (7.2). Passer la solution à l'autoclave. La précipitation qui suit le passage à l'autoclave n'a pas d'influence sur la qualité. Agiter la solution avant de l'utiliser. Conserver la solution de micronutriments à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver la solution de micronutriments plus de 12 mois.

#### 7.4.7 Solution de $\text{FeCl}_3$ .

Peser 0,2 g de  $\text{Fe(III)Cl}_3$  hexahydraté (7.1.9) et le dissoudre dans 20 ml d'eau ultrapure (7.2). Stériliser la solution de  $\text{FeCl}_3$  par filtration (0,2  $\mu\text{m}$ ). Conserver la solution de  $\text{FeCl}_3$  à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver la solution de  $\text{FeCl}_3$  plus de six mois.

#### 7.4.8 Solution de $\text{Ca(NO}_3)_2$ .

Peser 10 g de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  (7.1.10) et les dissoudre dans 10 ml d'eau ultrapure (7.2). Stériliser la solution de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  par filtration (0,2  $\mu\text{m}$ ). Conserver la solution de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver la solution de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  plus de six mois.

#### 7.4.9 Mélange de vitamines.

Peser séparément les produits chimiques suivants:

0,2 g de D-pantothénate de calcium (7.1.11), 0,2 g de chlorhydrate de thiamine (7.1.12), 0,05 g de niacine (7.1.13), 0,02 g de biotine (7.1.15), 0,2 g de chlorhydrate de pyridoxine (7.1.14), 2 g d'inositol (7.1.16).

Mélanger et dissoudre les vitamines dans 50 ml d'eau ultrapure (7.2). Stériliser le mélange de vitamines par filtration (0,2  $\mu\text{m}$ ). Conserver le mélange de vitamines à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Ne pas conserver le mélange de vitamines plus de six mois.

#### 7.4.10 Milieu minimal maltosé pour levures.

Ajouter à la pipette 1 ml de solution de  $\text{FeCl}_3$  (7.4.7), 1 ml de solution de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  (7.4.8), 1 ml de solution de micronutriments (7.4.6) et 0,5 ml de mélange de vitamines (7.4.9) à 96,5 ml de la solution saline (7.4.4). Ajouter 100 ml de solution de maltose (7.4.3).