

ISO/TC 147/SC 5

Date: 2022-10-03

ISO 19040-2:2018(F)

ISO/TC 147/SC 5

Secrétariat: DIN

Qualité de l'eau — Détermination du potentiel ~~œstrogénique~~ **œstrogène** de l'eau et des eaux résiduaires ~~en fonction des agonistes et des antagonistes du récepteur des œstrogènes~~ — **Partie 2: Essai d'œstrogénicité sur levures Test d'œstrogénicité (A-YES, *Arxula adenivorans*)**

*Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water related to agonists and antagonists of the estrogen receptor — Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, *Arxula adenivorans*)*

ISO 19040-2:2018

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

Style Definition: Heading 1: Indent: Left: 0 pt, First line: 0 pt
Style Definition: Heading 2: Font: Bold, Tab stops: Not at 18 pt
Style Definition: Heading 3: Font: Bold
Style Definition: Heading 4: Font: Bold
Style Definition: Heading 5: Font: Bold
Style Definition: Heading 6: Font: Bold
Style Definition: ANNEX
Style Definition: RefNorm
Style Definition: Body Text_Center
Style Definition: Dimension_100
Style Definition: Figure Graphic
Style Definition: Figure subtitle
Style Definition: List Continue 1
Style Definition: List Number 1
Style Definition: AMEND Terms Heading: Font: Bold
Style Definition: AMEND Heading 1 Unnumbered: Font: Bold

ISO 19040-2:2018(F)

DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office

Ch. de Blandonnet 8 • CP 401

CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland

Tel. + 41 22 749 01 11

Fax + 41 22 749 09 47

copyright@iso.org

www.iso.org

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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>

Sommaire

Page

Avant-propos	Error! Bookmark not defined.
1 Domaine d'application.....	Error! Bookmark not defined.
2 Références normatives.....	Error! Bookmark not defined.
3 Termes et définitions	Error! Bookmark not defined.
4 Principe	Error! Bookmark not defined.
5 Interférences.....	Error! Bookmark not defined.
6 Appareillage et matériel.....	Error! Bookmark not defined.
7 Réactifs, milieux et souches d'essai	Error! Bookmark not defined.
8 Échantillonnage et échantillons.....	Error! Bookmark not defined.
8.1 Généralités.....	Error! Bookmark not defined.
8.2 Flacons et matériel d'échantillonnage.....	Error! Bookmark not defined.
8.3 Nettoyage préalable des flacons et du matériel.....	Error! Bookmark not defined.
8.4 Mode opératoire d'échantillonnage	Error! Bookmark not defined.
8.5 Transport des échantillons	Error! Bookmark not defined.
8.6 Prétraitement des échantillons	Error! Bookmark not defined.
8.7 Conservation des échantillons	Error! Bookmark not defined.
9 Mode opératoire	Error! Bookmark not defined.
9.1 Configuration d'essai.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.1 Préparation de la gamme de dilution de référence.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.2 Réactivation de la levure.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.3 Témoin négatif	Error! Bookmark not defined.
9.1.4 Réplicat à blanc	Error! Bookmark not defined.
9.1.5 Dilution de l'échantillon.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.6 Blanc de terrain.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.7 Préparation de la plaque.....	Error! Bookmark not defined.
9.1.8 Inoculation de la plaque d'essai.....	Error! Bookmark not defined.
9.2 Mesurage	Error! Bookmark not defined.
9.2.1 Mesurage de l'activité du gène rapporteur	Error! Bookmark not defined.
9.2.2 Mesurage de la densité cellulaire.....	Error! Bookmark not defined.
9.3 Calculs	Error! Bookmark not defined.
9.3.1 Correction du bruit de fond.....	Error! Bookmark not defined.
9.3.2 Calcul de la croissance relative	Error! Bookmark not defined.
9.3.3 Calculs pour l'évaluation des blancs d'échantillon.....	Error! Bookmark not defined.
9.3.4 Calcul de l'induction du gène rapporteur	Error! Bookmark not defined.
10 Critères de validité.....	Error! Bookmark not defined.
11 Critères d'évaluation	Error! Bookmark not defined.
12 Rapport d'essai.....	Error! Bookmark not defined.
13 Vérification	Error! Bookmark not defined.
Annexe A (informative) Préparation de la plaque.....	Error! Bookmark not defined.
Annexe B (informative) Lyophilisation des cellules d' <i>Arxula adenivorans</i>	Error! Bookmark not defined.

ISO 19040-2:2018(F)

Annexe C (informative) **Schéma de principe de l'essai**..... Error! Bookmark not defined.

Annexe D (informative) **Configuration d'essai pour les produits chimiques et les extraits**Error! Bookmark not defined.

Annexe E (informative) **Préparation d'une gamme de dilution** Error! Bookmark not defined.

Annexe F (informative) **Données de performances**..... Error! Bookmark not defined.

Annexe G (informative) **Évaluation statistique** Error! Bookmark not defined.

Annexe H (informative) **Calcul des équivalents œstradiol**..... Error! Bookmark not defined.

Annexe I (informative) **Autre conception d'essai pour la détermination de EEQ**Error! Bookmark not defined.

Annexe J (informative) **Mesurage de la plus faible dilution sans effet (LID) d'eaux résiduaire**s — **Évaluation simplifiée pour les essais d'eaux résiduaire**sError! Bookmark not defined.

Annexe K (informative) **Exemple d'évaluation statistique** Error! Bookmark not defined.

Bibliographie Error! Bookmark not defined.

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).

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).

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 [le lien suivant: 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 \[www.iso.org/fr/members.html\]\(http://www.iso.org/fr/members.html\).](#)

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Qualité de l'eau — Détermination du potentiel œstrogénique de l'eau et des eaux résiduares en fonction des agonistes et des antagonistes du récepteur des œstrogènes — Partie 2: Essai d'œstrogénicité sur levures 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 résiduares 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 stéroïdogenèse, 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 α) 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 résiduares;
- à l'eau de mer;
- à l'eau saumâtre;

ISO 19040-2:2018(F)

- 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 β -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 β -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).

~~<std>ISO 3696, Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai</std>~~

~~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 répliat à blanc

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

[SOURCE: ISO 10872:2010, 3.5]

3.2

Formatted: Pattern: Clear

Commented [eXtyle2]: The match came back with a different title. The original title was: Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai

Commented [eXtyle3]: The text ";" is marked with "Hyperlink" character style but does not appear to be a hyperlink. Please check the text.

Commented [eXtyle4]: The text "." is marked with "Hyperlink" character style but does not appear to be a hyperlink. Please check the text.

Commented [eXtyle5]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced
ISO 10872:2020, Qualité de l'eau et du sol — Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (Nematodes)

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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 résiduaires et d'eau de dilution en tant que nombre entier

Note 1 à l'article: Pour de l'eau ou pour des eaux résiduaires 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 %

CE₅₀

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

Note 1 à l'article: Au sens du présent document, la CE₅₀ 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

récipient 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.

Commented [eXtyle6]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 6107:2021, Qualité de l'eau — Vocabulaire

Formatted: Pattern: Clear

STANDARD PREVIEW
 (standards.iteh.ai)
 ISO 19040-2:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ef13823-4086-4a56-86cf->

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Commented [eXtyle7]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 10253:2016, Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema* sp. et *Phaeodactylum tricornutum*

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

ISO 19040-2:2018(F)

[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 (ERα) en présence d'un échantillon contenant des composés qui provoquent des effets œstrogéniques. Ainsi, le dosage détecte

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Commented [eXtyle8]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 6107:2021, Qualité de l'eau — Vocabulaire

Commented [eXtyle9]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 6107:2021, Qualité de l'eau — Vocabulaire

Formatted: Pattern: Clear

Commented [eXtyle10]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 6107:2021, Qualité de l'eau — Vocabulaire

Formatted: Pattern: Clear

Commented [eXtyle11]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 7405:2018, Médecine bucco-dentaire — Évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en médecine bucco-dentaire

Commented [eXtyle12]: The reference is to a withdrawn standard which has been replaced

ISO 6107:2021, Qualité de l'eau — Vocabulaire

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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 α 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.

Formatted: Pattern: Clear

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).

Formatted: Pattern: Clear

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 réplicat à blanc (3.1). Voir l'Article 10 pour de plus amples informations.

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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.

Formatted: Pattern: Clear

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:

Formatted: Pattern: Clear

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 ± 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).

Formatted: Pattern: Clear

ISO 19040-2:2018(F)

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 µm.

6.7 **Pipettes à canal unique**, volume nominal de 10 µl à 10 000 µl.

6.8 **Pipettes à canaux multiples**, volume nominal de 100 µl et 300 µl.

6.9 **Plaques à 96 puits en polystyrène transparent à fond plat (profil F, 300 µl) 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 ± 20 nm et de 630 nm ± 5 nm, ou de 600 nm ± 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-oestradiol**, ≥ 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 %, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, H_2O , masse moléculaire 360,32 g/mol, CAS: 6363-53-7.

ISO 19040-2:2018(F)

7.1.6 Nitrate de sodium, > 99 %, NaNO_3 , masse moléculaire 84,98 g/mol, CAS: 7631-99-4.

7.1.7 Dihydrogénophosphate de potassium, ≥ 99 %, KH_2PO_4 , masse moléculaire 136,09 g/mol, CAS: 7778-77-0.

7.1.8 Sulfate de magnésium pur, 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, $\geq 98,5$ %, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, masse moléculaire 244,31 g/mol, CAS: 58-85-5.

7.1.16 Inositol, ≥ 99 %, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 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 %, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 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 %, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, masse moléculaire 169,02 g/mol, CAS: 10034-96-5.

7.1.21 Sulfate de zinc heptahydraté, > 99,5 %, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, masse moléculaire 287,56 g/mol, CAS: 7446-20-0.

7.1.22 Molybdate de sodium dihydraté, > 99,5 %, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 %, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, masse moléculaire 294,10 g/mol, CAS: 6132-04-3.

7.1.25 Acide citrique, > 99,5 %, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, masse moléculaire 192,12 g/mol, CAS: 77-92-9.

7.1.26 4-nitrophénylphosphate, sel disodique hexahydraté (pNPP), $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, masse moléculaire 371,14 g/mol, CAS: 333338-18-4.

ISO 19040-2:2018(F)

7.1.27 Hydroxyde de sodium, ≥ 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, ≥ 99 %, NaCl, masse moléculaire 58,44 g/mol, CAS: 7647-14-5.

7.1.30 Acétone (pureté «pour analyses »), C₃H₆O, 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 µS/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 µm).

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-hERα-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-hERα-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.

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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

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

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

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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

7.4.2 Solution de travail de 17β-œstradiol (E2).

Diluer la solution mère de 17β-œstradiol (E2) (7.4.1) à 1→100 en ajoutant 10 µl de la solution mère de 17β-œstradiol (E2) (7.4.1) à 990 µl d'éthanol (7.1.3) et bien mélanger. Effectuer une dilution supplémentaire à 1→10 en ajoutant 100 µl de la première dilution à 900 µl 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 17β-œstradiol (E2) à ≤ -18 °C. Ne pas conserver la solution de travail plus de 6 mois.

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

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.

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

7.4.4 Solution saline pour milieu minimal pour levures.

Dissoudre 3,7 g de NaNO₃ (7.1.6), 8,4 g de KH₂PO₄ (7.1.7) et 1 g de MgSO₄ (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.

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear

7.4.5 Solution saline pour milieu salin minimal pour levures.

Dissoudre 28 g de NaCl (7.1.29), 3,7 g de NaNO₃ (7.1.6), 8,4 g de KH₂PO₄ (7.1.7) et 1 g de MgSO₄ (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 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.

Formatted: Pattern: Clear

7.4.6 Solution de micronutriments.

Peser séparément les produits chimiques suivants:

0,05 g de H₃BO₃ (7.1.17), 0,01 g de CuSO₄·5H₂O (7.1.18), 0,01 g de KI (7.1.19), 0,04 g de MnSO₄·H₂O (7.1.20), 0,04 g de ZnSO₄·7H₂O (7.1.21), 0,02 g de Na₂MoO₄·2H₂O (7.1.22), 0,01 g de CoCl₂ (7.1.23).

Formatted: Pattern: Clear

Formatted: Pattern: Clear