

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
19040-3

Première édition  
2018-08

---

---

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

**Partie 3:  
Essai in vitro sur cellules humaines  
avec gène rapporteur**

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

*Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay*

ISO 19040-3:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/865f08ac-2b8e-4a5b-8c28-7f28ab3c4a5c/iso-19040-3-2018>



Numéro de référence  
ISO 19040-3:2018(F)

© ISO 2018

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 19040-3:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/865f08ac-2b8e-4a5b-8c28-7f28ab3c4a5c/iso-19040-3-2018>



**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>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Interférences</b> .....	<b>4</b>
<b>5</b> <b>Principe</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b> <b>Appareillage et matériel</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b> <b>Réactifs, cellules et milieux</b> .....	<b>6</b>
<b>8</b> <b>Échantillonnage et échantillons</b> .....	<b>9</b>
8.1    Généralités .....	9
8.2    Flacons et matériel d'échantillonnage .....	9
8.3    Nettoyage préalable des flacons et du matériel .....	10
8.4    Mode opératoire d'échantillonnage .....	10
8.5    Transport des échantillons .....	10
8.6    Prétraitement de l'échantillon .....	10
8.7    Conservation des échantillons .....	11
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>11</b>
9.1    Entretien de la culture cellulaire .....	11
9.1.1    Congélation des cellules .....	11
9.1.2    Démarrage d'une nouvelle culture cellulaire .....	11
9.1.3    Culture des cellules .....	11
9.2    Mode opératoire d'essai sur cellules humaines avec gène rapporteur .....	12
9.2.1    Ensemencement des cellules (jour 1) .....	12
9.2.2    Préparation de la référence E2 (jour 2) .....	12
9.2.3    Préparation des dilutions d'échantillon (jour 2) .....	13
9.2.4    Blanc de terrain .....	13
9.2.5    Exposition des cellules (jour 2) .....	14
9.2.6    Récolte des cellules (jour 3) .....	14
9.2.7    Mesurage de la luminescence (jour 3) .....	14
9.3    Analyse des données .....	14
9.3.1    Calcul de l'induction du gène rapporteur .....	14
9.3.2    Calcul du pourcentage de réponse maximale .....	15
9.3.3    Calcul de la courbe dose-effet .....	15
<b>10</b> <b>Critères de validité</b> .....	<b>16</b>
10.1    Critères de validité pour l'essai .....	16
10.2    Critères de validité pour les échantillons .....	16
<b>11</b> <b>Critères d'évaluation</b> .....	<b>16</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe A (informative) Réglages du luminomètre</b> .....	<b>18</b>
<b>Annexe B (informative) Préparation de la plaque</b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe C (informative) Caractéristiques et détails de l'essai biologique</b> .....	<b>20</b>
<b>Annexe D (informative) Configuration d'essai pour les produits chimiques et les extraits</b> .....	<b>22</b>
<b>Annexe E (informative) Préparation d'une gamme de dilution</b> .....	<b>24</b>
<b>Annexe F (informative) Données de performance</b> .....	<b>25</b>
<b>Annexe G (informative) Évaluation statistique</b> .....	<b>35</b>
<b>Annexe H (informative) Calcul des équivalents 17<math>\beta</math>-œstradiol</b> .....	<b>36</b>

<b>Annexe I (informative) Mesurage de la plus faible dilution sans effet (LID) d'eaux résiduaires — Évaluation simplifiée pour les essais d'eaux résiduaires</b> .....	<b>38</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>41</b>

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 19040-3:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/865f08ac-2b8e-4a5b-8c28-7f28ab3c4a5c/iso-19040-3-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/865f08ac-2b8e-4a5b-8c28-7f28ab3c4a5c/iso-19040-3-2018>

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

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/foreword.html](http://www.iso.org/iso/foreword.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 oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires —

## Partie 3:

## Essai *in vitro* sur cellules humaines avec gène rapporteur

**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 utilisant des cellules humaines transfectées de façon stable. 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 0,3 ng/l et 1 ng/l d'équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) sur la base des résultats de l'essai interlaboratoires international (voir l'[Annexe F](#)). Le domaine de mesure supérieur a été évalué [sur la base des résultats de l'essai interlaboratoires international (voir le [Tableau E.3](#))] jusqu'à un niveau de 75 ng d'EEQ/l. 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:

- Plateforme de consultation en ligne de l'ISO: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>.

**3.1 milieu de culture**  
substances nutritives se présentant sous une forme et une phase (liquide ou solidifiée) favorisant la croissance cellulaire

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 24, modifiée — «cellulaire» remplace «microbiologique»]

**3.2 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]

**3.3 eau de dilution**  
eau stérile ajoutée à l'échantillon soumis à essai afin de préparer une série définie de dilutions

[SOURCE: ISO 20079:2005, 3.7]

**3.4 EC<sub>50</sub>**  
concentration efficace d'un composé produisant 50 % d'un effet

Note 1 à l'article: Au sens du présent document, la EC<sub>50</sub> est la concentration efficace d'un composé qui induit 50 % de l'activité maximale du gène rapporteur qui peut être atteinte par ce composé.

**3.5 extrait**  
échantillon pour essai après extraction et élimination éventuelle du milieu d'extraction

**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 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 ou avec un témoin positif, à la valeur moyenne des puits correspondants traités avec le témoin négatif à l'aide des mêmes cellules, dans des conditions identiques

[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»; «cellules» remplace «souche »]

**3.8****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]

**3.9****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 »]

**3.10****témoin négatif**

eau de dilution sans l'échantillon pour essai

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 51] <https://standards.iteh.ai/iso-19040-3-2018>

**3.11****nombre de passages**

nombre de repiquages de cellules dans un nouveau récipient de culture (flacon de culture cellulaire ou microplaque)

**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****unités de lumière relative****RLU**

niveau d'activité du gène rapporteur tel que mesuré par la lumière produite à l'aide d'un luminomètre, exprimé en unités de lumière relative

**3.14****activité du gène rapporteur**

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

## 3.15

### **culture mère**

culture congelée afin de conserver les caractéristiques de la lignée cellulaire

[SOURCE: ISO 21427-2:2006, 13, modifiée — «de la lignée cellulaire» remplace «des cellules V79 »]

## 3.16

### **repiquage**

transfert d'une partie d'une culture cellulaire dans un nouveau récipient de culture cellulaire pendant la culture cellulaire

## 3.17

### **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 Interférences

Les effets toxiques présents dans les échantillons pour essai peuvent entraîner une réduction de la viabilité des cellules et donc une réduction de la réponse cellulaire mesurée. 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 [l'Article 9](#) pour de plus amples informations). Dans ce cas, il convient de diluer l'échantillon jusqu'à ce qu'aucune cytotoxicité ne soit plus observée (consulter le manuel de l'essai de cytotoxicité utilisé).

L'utilisation de dispositifs et/ou flacons d'échantillonnage inappropriés peut avoir une influence sur le résultat d'essai, car l'adsorption éventuelle de composés actifs sur les surfaces conduit à des résultats faux négatifs. D'autre part, des composés actifs peuvent être libérés dans l'échantillon par les flacons d'échantillonnage, en particulier si le matériel utilisé est en plastique, et des résultats faux positifs peuvent être générés. Voir [l'Article 7](#) pour de plus amples informations.

Une salinité élevée peut provoquer des effets toxiques dus à la pression osmotique résultante. Les cellules ER( $\alpha$ ) CALUX (Références [10] à [16]) tolèrent une conductivité de l'échantillon pouvant aller jusqu'à 34,000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (salinité de 1,0 % en fraction massique). Les contaminations bactériennes et fongiques peuvent avoir une influence négative sur la réponse des cellules. Par conséquent, des antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture cellulaire. La contamination des cellules est évaluée par un examen visuel (au microscope) lors des essais de l'échantillon. Voir [l'Article 9](#) 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.

Des composés antiœstrogéniques et d'autres composés inhibiteurs non toxiques peuvent masquer les effets œstrogéniques. La présence de composés interférents peut être évaluée à l'aide d'échantillons dopés avec une quantité définie d'un composé œstrogénique ayant des propriétés définies (par exemple 17 $\beta$ -œstradiol) provoquant une induction connue du système d'essai.

Les composés ayant des propriétés œstrogéniques peuvent être présents sous forme de conjugués inactifs. Une déconjugaison chimique peut être nécessaire pour quantifier le potentiel œstrogénique global d'un échantillon.

## 5 Principe

La signalisation induite par le récepteur des œstrogènes (ER) est essentielle dans l'action des œstrogènes et le mécanisme de signalisation du récepteur des œstrogènes est bien établi. La liaison

des œstrogènes à leur récepteur active ce dernier, qui se lie à des séquences de reconnaissance dans les régions promotrices des gènes cibles, appelées éléments de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces ERE ont été liés à un élément promoteur et à un gène induisant la transcription de la protéine luciférase facilement mesurable. Dans ces cellules, le récepteur activé par le ligand activera la transcription de la luciférase, et la protéine luciférase transcrite émettra une lumière lorsqu'un substrat sera ajouté. Le signal augmente en fonction de la dose du fait des concentrations croissantes de ligand. L'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires est mesurée à l'aide d'un luminomètre permettant d'obtenir des mesures fiables, sensibles et quantitatives.

## 6 Appareillage et matériel

Outre le matériel généralement présent dans un laboratoire pour la culture cellulaire, l'appareillage et le matériel suivants sont nécessaires. Pour des dispositifs d'échantillonnage appropriés, voir [l'Article 8](#).

- 6.1 **Hotte à flux laminaire**, standard: «risque biologique».
- 6.2 **Bain-marie**, 37 °C.
- 6.3 **Incubateur à CO<sub>2</sub>**, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, humidité 100 %.
- 6.4 **Microscope à contraste de phase inversé**.
- 6.5 **Congélateur**, au moins ≤ -18 °C et ≤ -70 °C.
- 6.6 **Agitateur pour microplaques**.
- 6.7 **Centrifugeuse**.
- 6.8 **Balance de laboratoire**.
- 6.9 **Pipettes stériles**, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml et 25 ml, en verre ou en plastique.
- 6.10 **Pipeteur**.
- 6.11 **Flacons de culture cellulaire**, 75 cm<sup>2</sup> avec bouchons filtrants.
- 6.12 **Récipients en plastique stériles**, 12 ml et 50 ml avec bouchon stérile.
- 6.13 **Plaques stériles à 12 puits**.
- 6.14 **Pipette à canaux multiples à répétition (pipette à répétition)**, avec embouts de 5 ml et 10 ml.
- 6.15 **Pipettes**, 1 µl, 50 µl, 200 µl et 1 000 µl, à embouts stériles.
- 6.16 **Pipettes à canaux multiples**, jusqu'à 50 µl et jusqu'à 300 µl.
- 6.17 **Plaques stériles en polystyrène à 96 puits**, à fond plat et couvercle transparents, appropriées pour la culture cellulaire, volume 300 µl par puits.
- 6.18 **Luminomètre pour microplaques avec deux injecteurs**, pour l'addition de substrat et de réactif d'arrêt.

6.19 Compteur de cellules ou hématimètre.

6.20 pH-mètre.

6.21 Flacons cryogéniques, stériles, 2 ml.

6.22 Récipient d'azote liquide pour le stockage à long terme des cellules.

6.23 Filtre, en acétate de cellulose, diamètre des pores 0,45 µm.

## 7 Réactifs, cellules et milieux

### 7.1 Réactifs

Dans la mesure du possible, utiliser des produits chimiques de «qualité réactif». Si les (différents) hydrates utilisés diffèrent des composés spécifiés, s'assurer que la masse appropriée du composé principal est employée.

7.1.1 Sulfoxyde de diméthyle (DMSO).

7.1.2 Glycérol pour biologie moléculaire, ≥ 99 %, masse moléculaire: 92,09 g/mol, CAS: 56-81-5.

7.1.3 17β-œstradiol, ≥ 98 %, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, masse moléculaire: 272,38 g/mol, CAS: 50-28-2.

7.1.4 Sel d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), CAS: 6381-92-6.

7.1.5 Trypsine, CAS: 9002-07-7.

7.1.6 Sérum fœtal bovin (FCS).

7.1.7 Milieu DMEM/F12 avec rouge de phénol comme indicateur de pH.

7.1.8 Acides aminés non essentiels (100x).

7.1.9 Pénicilline-streptomycine (100x), concentration utilisée 5 000 unités de pénicilline par ml/5 000 µg de streptomycine par ml.

7.1.10 Tampon phosphate salin pH 7,2 (PBS), sans calcium ni magnésium.

7.1.11 Adénosine-5'-triphosphate (ATP), CAS: 34369-07-8.

7.1.12 Acide trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N',N'-tétraacétique monohydraté (CDTA), CAS: 125572-95-4.

7.1.13 Dithiothréitol (DTT), CAS: 3483-12-3.

7.1.14 2-amino-2-(hydroxyl-méthyl)-1,3-propanediol (TRIS), CAS: 77-86-1.

7.1.15 Dextrane T500.

7.1.16 Charbon actif.

**7.1.17 Coenzyme A**, qualité acide libre, CAS: 85-61-0.

**7.1.18 D-luciférine, sel sodique**, CAS: 103404-75-7.

**7.1.19 Hydroxycarbonate de magnésium pentahydraté**,  $C_4H_2Mg_5O_{14}$ , CAS: 56378-72-4.

**7.1.20 Sulfate de magnésium**, CAS: 7487-88-9.

**7.1.21 Bicarbonate de sodium**, CAS: 144-55-8.

**7.1.22 Milieu de culture cellulaire en poudre**, Sigma, D2902, sans rouge de phénol ni bicarbonate de sodium.

**7.1.23 Tricine**, CAS: 5704-04-1.

**7.1.24 Acétone**, (pureté «pour analyses»), CAS: 67-64-1.

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

**7.1.26 Triton X-100**, CAS: 9002-93-1.

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

**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.

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 dilution progressive de l'échantillon pour essai.

### 7.3 Lignée cellulaire.

Lignée cellulaire humaine génétiquement modifiée, exprimant le récepteur des œstrogènes humains (hER $\alpha$  et/ou hER $\beta$ ) et contenant un plasmide rapporteur pour la luciférase. Des descriptions plus détaillées des lignées cellulaires individuelles sont données dans l'[Annexe C](#).

### 7.4 Milieu.

Utiliser toujours des solutions, une verrerie, etc. stériles. Effectuer tous les modes opératoires dans des conditions d'asepsie et dans l'environnement stérile d'une hotte à flux laminaire (standard pour les risques biologiques). Si un passage à l'autoclave est nécessaire, toujours effectuer cette opération pendant 20 min à (121  $\pm$  2) °C. Couvrir légèrement les récipients; ne jamais les fermer hermétiquement.

#### 7.4.1 Milieu de culture cellulaire.

Introduire 5,4 ml d'acides aminés non essentiels ([7.1.8](#)), 42 ml de FCS ([7.1.6](#)) et 1 ml de pénicilline-streptomycine ([7.1.9](#)) dans un flacon contenant 500 ml de milieu DMEM/F12 avec du rouge de phénol. Il convient de conserver le milieu de culture cellulaire préparé à 4 °C pendant huit semaines au maximum.

#### 7.4.2 Milieu de congélation.

Ajouter 1 ml d'acides aminés non essentiels, 10 ml de DMSO, 20 ml de FCS et 1 ml de pénicilline-streptomycine ([7.1.9](#)) à 68 ml de milieu DMEM/F12 avec du rouge de phénol. Répartir des

lots de 20 ml de façon stérile dans des tubes stériles. Il convient de conserver le milieu de congélation préparé à  $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation et de le conserver sur de la glace lors de l'utilisation.

### 7.4.3 Milieu d'essai concentré.

#### 7.4.3.1 Milieu d'essai concentré 3x.

Dissoudre le contenu d'un flacon de milieu de culture cellulaire en poudre (7.1.22) dans 250 ml d'eau (à température ambiante), puis dissoudre 3,7 g de bicarbonate de sodium (7.1.21) dans la même solution. Ajuster le pH à 7,4 à l'aide d'une solution de HCl 1 mol/l ou de NaOH 1 mol/l. Compléter au volume final de 300 ml avec de l'eau et stériliser par filtration. Ajouter 12 ml d'acides aminés non essentiels (7.1.8), 55 ml de sérum appauvri (7.4.8) et 37 ml de pénicilline-streptomycine (7.1.9). Il convient de conserver les milieux préparés à  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant huit semaines au maximum.

#### 7.4.3.2 Milieu d'essai concentré 1x.

Diluer 100 ml du milieu d'essai concentré 3x avec 200 ml d'eau et stériliser par filtration. Il convient de conserver les milieux préparés à  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant huit semaines au maximum.

### 7.4.4 Solution de trypsine.

Ajouter 20 ml de trypsine (7.1.5) à 980 ml de PBS (7.1.10) et ajouter 0,2 g d'EDTA (7.1.4). Stériliser la solution de trypsine par filtration et la diviser en aliquotes de 50 ml. La date de péremption est de 3 mois à compter du jour de la préparation. Conserver les tubes de trypsine à  $-20 ^\circ\text{C}$ .

### 7.4.5 Réactif d'arrêt.

Dissoudre 8,0 g d'hydroxyde de sodium dans un litre d'eau déminéralisée pour obtenir une concentration finale de 0,2 M.

### 7.4.6 Mélange de substrat.

Dissoudre complètement de la tricine (7.1.23) et du sulfate de magnésium (7.1.20) dans 500 ml d'eau déminéralisée jusqu'à ce que la solution soit transparente et incolore. Ajouter les autres produits chimiques du Tableau 1 et 400 ml d'eau. Ajuster le pH à 7,8 à l'aide d'une solution 1 mol/l de HCl et/ou de NaOH. Ajuster à un volume final de 1 l. Conserver à  $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant 3 mois au maximum ou à  $(-80 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant 12 mois au maximum.

Tableau 1 — Préparation du mélange de substrat (1 000 ml)

Composé	Masse	Masse moléculaire	Molarité
	g	g/mol	Mmol/l
Tricine	3,58	179,2	20
$\text{C}_4\text{H}_2\text{Mg}_5\text{O}_{14}$	0,52	485,69	1,1
$\text{MgSO}_4$	0,31	120,37	2,6
EDTA	0,037	372,23	0,10
DTT	5,14	154,2	33,3
Coenzyme A	0,21	767,6	0,27
Luciférine	0,15	320,32	0,47
ATP	0,29	551,1	0,53

### 7.4.7 Mélange de lyse

Dissoudre complètement les composés indiqués dans le Tableau 2 dans 500 ml d'eau déminéralisée. Ajuster le pH à 7,8 à l'aide de solutions de HCl à 1 mol/l et/ou de NaOH à 1 mol/l. Ajuster le volume



final à 1 l et diviser en aliquotes de 40 ml. Conserver à  $\leq -18$  °C (modifier pour tous les problèmes de T) pendant 1 an au maximum ou à 4 °C pendant un mois au maximum.

**Tableau 2 — Composition du mélange de lyse (1 000 ml)**

Composé	Masse	Volume	Masse moléculaire	Concentration
	g	ml		
Tris	3,0		121,1	25 mmol/l
DTT	0,31		154,2	2,0 mmol/l
CDTA	0,73		364,35	2,0 mmol/l
Glycérol		100		10 %
Triton X-100		10		1 %

#### 7.4.8 Sérum fœtal bovin appauvri

Dissoudre 0,6 g de Tris (7.1.14) dans 50 ml d'eau déminéralisée dans un bécher en verre de 500 ml et ajuster le pH à 8,0. Ajouter 450 ml d'eau déminéralisée, 0,25 g de Dextrane T500 (7.1.15) et 2,5 g de charbon actif (7.1.16). Fermer le bécher et agiter le mélange pendant toute une nuit à 4 °C. Décongeler également un flacon de FCS (7.1.6) pendant toute une nuit à 4 °C.

Le jour suivant, transférer 200 ml de FCS décongelé dans un flacon en verre stérile et chauffer pendant 30 min à 56 °C au bain-marie. Transférer la suspension de charbon dans 12 tubes de centrifugation de 50 ml et centrifuger les tubes pendant 20 min à 1 000 *g*. Décanter le surnageant. Répartir le FCS dans six tubes avec des culots de charbon et remettre en suspension. Incuber cette suspension pendant 45 min à 45 °C tout en agitant. Centrifuger les tubes pendant 20 min à 1 000 *g* et décanter le sérum dans les 6 autres tubes avec des culots de charbon frais. Incuber cette suspension pendant encore 45 min à 45 °C tout en agitant. Centrifuger les tubes pendant 20 min à 1 000 *g* et décanter le sérum dans les 6 tubes propres. Centrifuger à nouveau pendant 20 min à 1 000 *g* pour éliminer le charbon résiduel. Regrouper le sérum, stériliser par filtration et diviser en aliquotes de 55 ml. Conserver à  $-20$  °C pendant six mois au maximum.

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

Dissoudre 13,6 mg de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (7.1.3) dans 10 ml de DMSO (7.1.1). Diluer la solution mère 1 000x, par exemple en ajoutant à la pipette 1 ml à 9 ml de DMSO et ensuite 1 ml à 99 ml de DMSO (concentration finale de la solution mère: 5,0E-6 M). Conserver des aliquotes de 1 ml à  $\leq -18$  °C.

## 8 Échantillonnage et échantillons

### 8.1 Généralités

Le présent document décrit les exigences spécifiques relatives à l'échantillonnage en vue de la détermination de l'activité œstrogénique dans des échantillons d'eau. Pour des informations générales sur l'échantillonnage, se reporter à l'ISO 5667-16.

### 8.2 Flacons et matériel d'échantillonnage

Utiliser des flacons en verre (verre borosilicaté) propres, de préférence avec des bouchons en polypropylène ou des bouchons revêtus de polytétrafluoroéthylène (PTFE). Pour éviter la photodégradation des composés présentant un intérêt, utiliser de préférence des flacons en verre ambré. Lorsque des flacons en verre transparent sont utilisés, envelopper les flacons d'une feuille d'aluminium ou les conserver dans un récipient sombre.

En variante, des flacons en aluminium ou en acier inoxydable (tous deux non revêtus) peuvent être utilisés. S'assurer qu'un matériau autre que le verre borosilicaté n'a pas d'incidence sur les résultats.