

Analyse de l'activité œstrogénique dans l'eau dans le cadre des programmes de surveillance chimique de la DCE à l'aide de bioessais *in vitro* – **Recommandations techniques**



6 octobre 2026

Abd El Rahman EL MAIS et Sélim AIT-AISSA

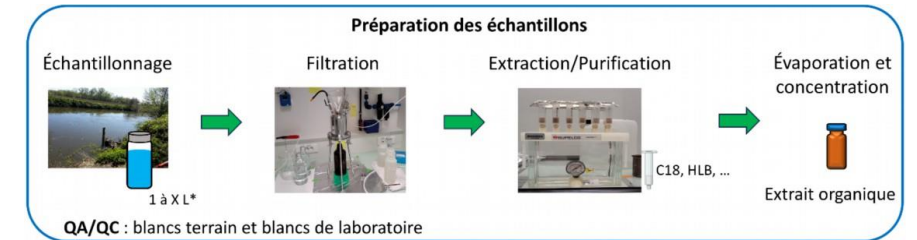
*Analyse de l'activité œstrogénique dans l'eau
dans le cadre des programmes de surveillance
chimique de la DCE à l'aide de bioessais in vitro*

Recommandations techniques

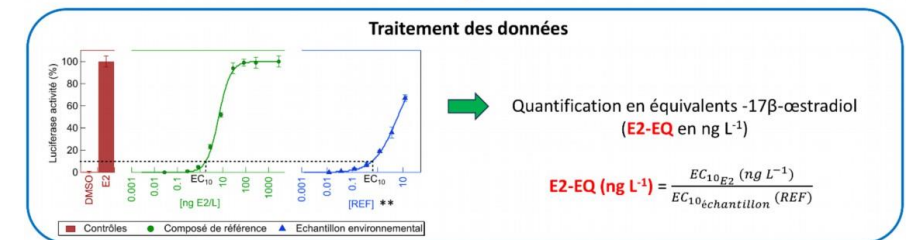
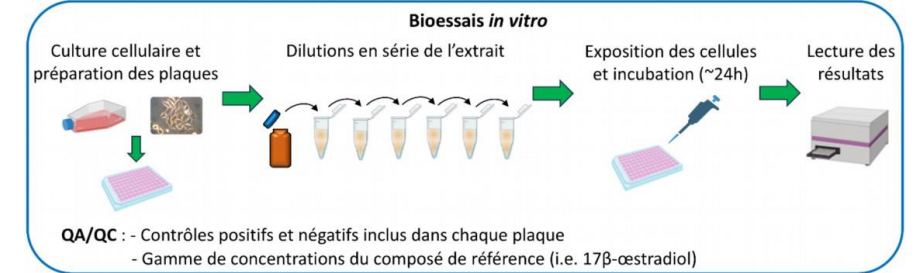
Edition 2026

Structure du guide

1) Échantillonnage, transport vers le laboratoire et préparation des échantillons



2) Bioessais *in vitro* : de la réalisation des essais à la détermination des équivalents œstradiol (E2-EQ)



3) Déploiement des bioessais : rôles et responsabilités des acteurs/prestataires dans la chaîne de mesure de l'activité œstrogénique

Échantillonnage, transport et préparation des échantillons

Échantillonnage



Ponctuel ou
composite



Transport



Filtration



Extraction SPE



Évaporation et
concentration



Extrait organique

Échantillonnage



Ponctuel ou composite



Flaconnage compatible

Verre, inox ou HDPE (Nalgene™)



Prévention des contaminations

Précautions terrain, porter des gants en nitrile



Volume recommandé

≥ 1 L pour les eaux de surface ; jusqu'à 5 L pour des matrices plus diluées comme les eaux littorales



Assurance et contrôle de la qualité (QA / QC)

Blancs terrains (BT): 1 par jour, site et/ou équipe préleveur ; eau non contaminée (e.g. qualité LC/MS, Evian) suivant exactement le même processus que les échantillons réels (prélèvement → analyse)



Options

Possibilité d'acidifier l'échantillon (H_2SO_4 , pH ≈ 3) pour éviter la dégradation des hormones

Transport vers le laboratoire

Échantillonnage



Ponctuel ou
composite

Transport



$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Température de transport



$\leq 24 \text{ h}$

Livraison : durée idéale pour éviter une dégradation des hormones



3 jours

Délai maximal ; dépassement à notifier

Préparation des échantillons : Filtration

Échantillonnage



Ponctuel ou composite

Transport



Filtration



Une étape recommandée systématiquement, surtout avant extraction sur colonne SPE

Pourquoi ?

Éliminer les matières en suspension susceptibles d'interférer avec l'extraction (e.g. colmatage des colonnes SPE)

Quand ?

À réception au laboratoire **et avant toute congélation éventuelle** (si l'échantillon ne peut pas être traité dans les 3 jours).

Comment ?

- | GF/F 0,7 µm préalablement calcinés (> 400 °C, ≥ 5 h).
- | **Si MES élevées** : GF/A 1,6 µm puis GF/F 0,7 µm

NOTE : Fraction brute vs fraction après filtration?

Option « filtré » retenue pour cette version du guide. À réévaluer si l'analyse sur l'échantillon brut devient nécessaire pour être comparable à l'analyse chimique des hormones → L'extraction SPE desk serait notamment recommandée.

Préparation des échantillons : Extraction sur phase solide (SPE)

Échantillonnage



Ponctuel ou
composite

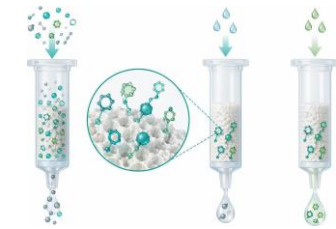
Transport



Filtration



Extraction SPE



Extraction SPE : Extraire les molécules organiques d'intérêt et les concentrer afin d'optimiser leur détection

Principe

Retenir les composés organiques sur une phase solide (adsorbant), puis les éluer avec un solvant organique avant concentration

Phase recommandée (adsorbant)

- | **HLB ou HR-X** : spectre large de polarités
- | Alternative : C₁₈ plus sélective (E2, EE2, E1, E3) mais **moins performante** (bisphénols et alkylphénols)

Timing

- | **Juste après filtration.**
- | À défaut, conserver le filtrat à +4 °C (≤ 24 h). Sinon, à -20 °C pour une extraction ultérieure.

NOTE : dans le cadre d'une campagne de surveillance, il est important de suivre les **mêmes modalités pour tous les échantillons** (filtration, conservation du filtrat, extraction)

Préparation des échantillons : Évaporation et concentration

Échantillonnage



Ponctuel ou
composite

Transport



Filtration



Extraction SPE



Évaporation et
concentration



Extrait organique

Après l'extraction : préparer l'extrait pour l'analyse par bioessai



1. Evaporer

Évaporer l'extrait jusqu'à sec



2. Reconstituer

- | Dissoudre l'extrait sec dans un solvant organique compatible avec le bioessai (DMSO ou MeOH)
- | Choisir un volume qui permet un facteur d'enrichissement relatif (**REF**) maximal

Critère visuel : extrait homogène, sans particules résiduelles.

REF = facteur de dilution/concentration de l'échantillon qui intègre toutes les étapes depuis la concentration de l'échantillon initial jusqu'à la dilution finale dans le bioessai

E.g., eau de surface : tester en première intention une gamme de concentrations allant de **0,1 à 20 REF**

Préparation des échantillons : assurance et contrôle de la qualité (QA / QC)

Échantillonnage



Ponctuel ou composite



Transport



Filtration



Extraction SPE



Évaporation et concentration



Extrait organique

QA / QC

1. Blanc terrain (BT)

2. Blancs de laboratoire

- | **Blanc de filtration** : filtration de 1 L d'eau ultrapure avec le même dispositif que les échantillons, puis préparer l'extrait selon le même protocole
- | **Blanc d'extraction** : extraction d'une cartouche SPE vierge selon le même protocole que les échantillons

RÈGLE D'ANALYSE



BT négatif

Tester les blancs de laboratoire **n'est pas utile**



BT contaminé

Tester les blancs de laboratoire **est impératif** afin d'identifier l'origine de la contamination

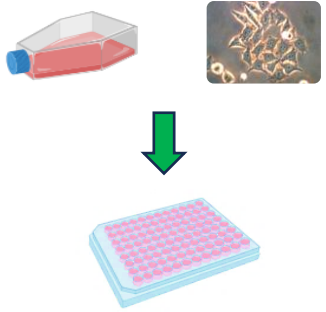


Pas de BT

Tester les blancs de laboratoire **est impératif**

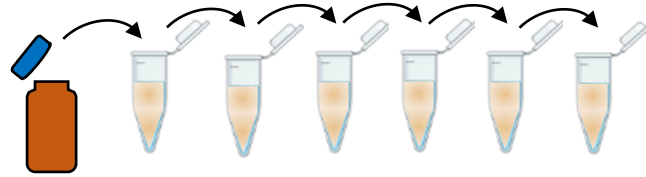
Réalisation des bioessais

Cultures cellulaires



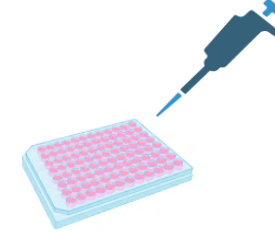
96 ou 384 puits ; cellules ou levures selon le système

Dilutions en série de l'extrait organique



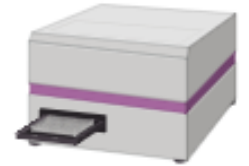
Échantillon testé sur plusieurs REF ; concentration en solvant (DMSO) constante.

Exposition des cellules et incubation (16–24 h)



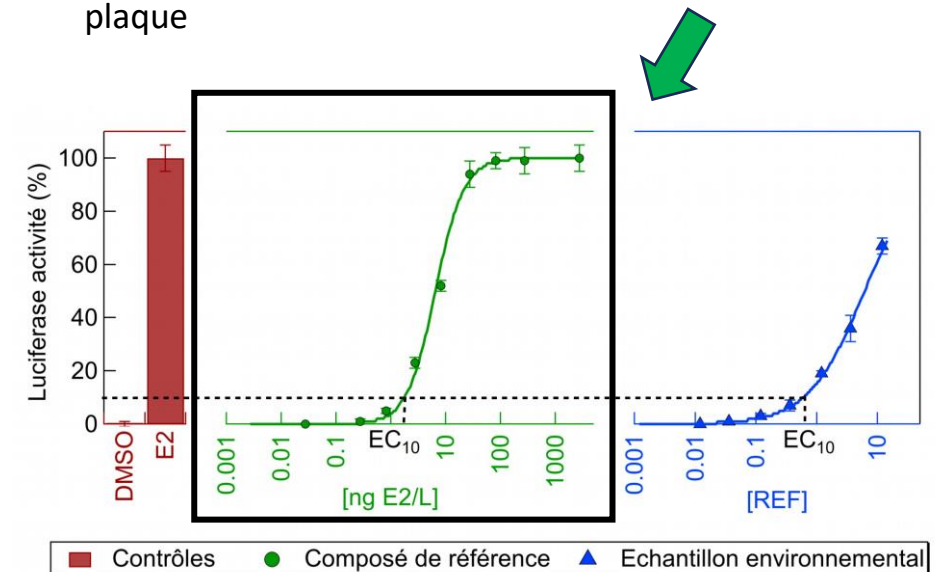
QA / QC : Contrôle négatif solvant et contrôle positif E2 dans chaque plaque

Lecture des résultats



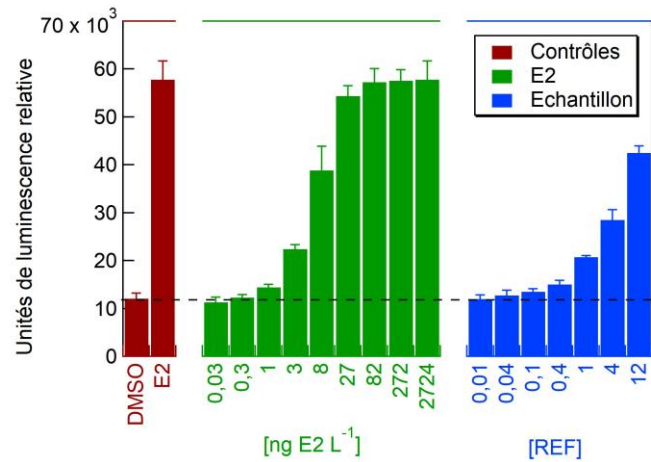
Luminescence, fluorescence ou absorbance

QA / QC : Vérification de la sensibilité du bioessai : courbe concentration-réponse du 17 β -estradiol (≥ 7 concentrations) réalisée au cours de chaque série d'analyse



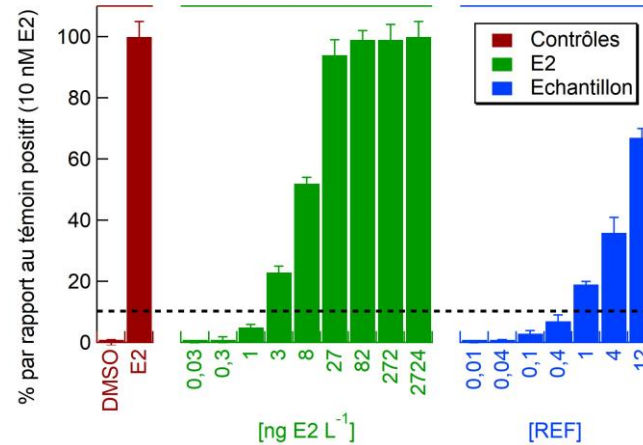
Traitement des données et calcul d'équivalents-œstradiol (E2-EQ)

A) Résultats bruts (e.g. en unités de luminescence)



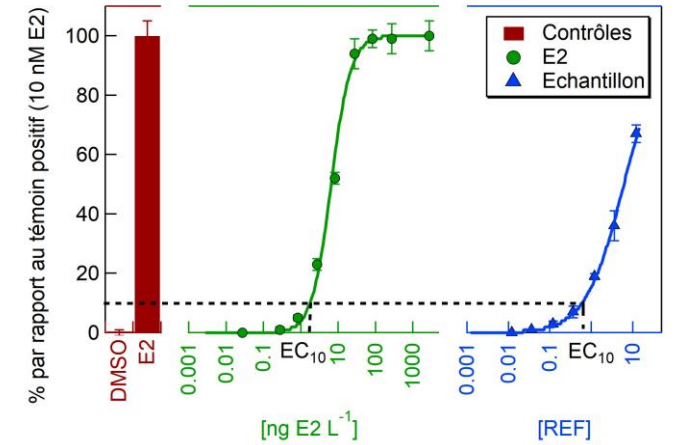
B) Normalisation (%) par rapport au contrôle positif (E2)

$$\% \text{ d'effet} = \frac{RLU_{\text{échantillon}} - RLU_{\text{contrôle DMSO}}}{RLU_{E2} - RLU_{\text{contrôle DMSO}}}$$



C) Modélisation et détermination de l'EC₁₀

R, GraphPad, RegTox Microsoft Excel™, ...



Échantillon actif

Échantillon inactif

Quantification en équivalents
17β-œstradiol (E2-EQ en ng L⁻¹)

$$E2 - EQ = \frac{EC_{10E2}}{EC_{10\text{échantillon}}}$$

Détermination de la limite de
quantification

$$LOQ = \frac{EC_{10E2} (ng/L)}{REF \text{ maximal testé}}$$

Critères de validité des essais

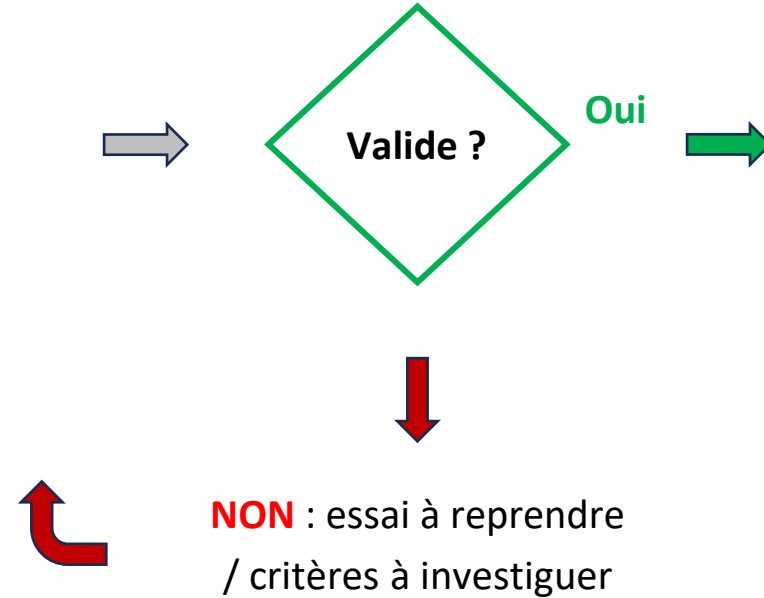
1) Réponse des témoins positif et négatif

EC₅₀ de référence (E2)

- | 1,6–34 pmol/L (NF EN ISO 19040-3)
- | 8–40 pmol/L (MELN)

Induction positif / négatif

- | Supérieure au seuil attendu du bioessai (en général entre 3 et 10)



2) Analyse de l'échantillon

Absence d'interférence / cytotoxicité

Pas d'inhibition du signal aux plus fortes concentrations testées.

Si inhibition observée

Tester des dilutions plus faibles afin d'identifier la concentration maximale sans effet cytotoxique.

E2-EQ calculée uniquement sur les concentrations sans effet cytotoxique

NOTE :

- | Si le BT est positif, l'échantillon est considéré actif uniquement **si son E2-EQ est ≥ 3 fois celui du BT**
- | Échantillons **positifs** : confirmation par un second essai indépendant
- | Échantillons **négatifs** : un seul essai si les critères d'acceptabilité sont respectés

- Les bioessais considérés dans ce guide sont tous basés sur le mode d'action des œstrogènes, i.e., leur capacité à se lier au récepteur des œstrogènes alpha (ER α) et à activer l'expression de gènes cibles de ce récepteur.

Bioessai	Cellule humaine ou de levure / gène rapporteur	Texte normatif	Comparaison inter-laboratoires
L-YES	Levure / β -galactosidase	NF EN ISO 19040-1	ISO 19040, [6]
A-YES	Levure / phytase	NF EN ISO 19040-2	ISO 19040, [13]
YES	Levure / β -galactosidase	-	[6], [14], [15]
ERα-CALUX®	U2OS / luciférase	NF EN ISO 19040-3	[5], [6], [14], [15]
MELN	MCF7 / luciférase	NF EN ISO 19040-3	[5], [6], [14], [15]
hERα-HeLa-9903	HeLa / luciférase	OECD 455 NF EN ISO 19040-3	OECD 455, [5], [6]
HELN-ERα	HeLa / luciférase	NF EN ISO 19040-3	-
T47D-kbLuc	T47D / luciférase	NF EN ISO 19040-3	[14], [15]
VM7Luc4E2	MCF7 / luciférase	OECD 455	OECD 455
ER-GeneBlazer	HEK293T / FRET (fluorescence) -	-	[5], [6], [14]

[5] Könemann *et al.* 2018 ; [6] Gómez *et al.* 2021 ; [13] Hettwer *et al.* 2017 ; [14] Kunz *et al.* 2017 ; [15] Leusch *et al.* 2010

- ≠ degrés de validation : normes internationales (ISO, OCDE) et études inter-laboratoires.
- NF EN ISO 19040: standard de référence pour la mesure de l'activité œstrogénique dans les eaux naturelles et les eaux usées.
- Plusieurs méthodes validées démontrent des performances comparables pour la mesure de l'activité œstrogénique dans les eaux
- Point critique** : vérification de la LQ dans chaque laboratoire, ajustable notamment par le facteur de concentration des échantillons.

Déploiement des bioessais *in vitro*

- Les étapes d'échantillonnage, gestion et préparation des échantillons sont similaires aux analyses chimiques classiques.
- Les compétences nécessaires (culture cellulaire, tests biochimiques) sont déjà disponibles dans les laboratoires de toxicologie environnementale.
- Peu d'acteurs proposent actuellement l'ensemble de la chaîne analytique, **mais aucun verrou technique majeur n'est identifié pour un déploiement en routine.**
- Des bioessais sont déjà disponibles commercialement, du matériel biologique jusqu'à la mise en œuvre complète.

Bioessai <i>in vitro</i>	Disponibilité commerciale du matériel biologique		Prestation de bioanalyse par des laboratoires privés en Europe	
	Modèle cellulaire	Kit	Préparation d'échantillon	Réalisation du test et traitement de la donnée (en E2-EQ)
ER α -CALUX®	Oui	Oui	Oui	Oui
MELN	Oui	Non	Oui	Oui
hER α -HeLa-9903	Oui	Non	-	-
VM7Luc4E2	Oui	Oui	-	-
HELN-hER α	Oui	Non	Oui	Oui
T47D-kbLuc	Oui	Non	-	-
ER-GeneBlazer	Oui	Oui	-	-
L-YES / A-YES	-	Oui	-	-

Merci pour votre attention !

