

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

Contexte de programmation et de réalisation

Ce guide a été réalisé dans le cadre du programme d'actions AQUAREF 2023-2026.

Auteurs

Abd El Rahman EL MAIS (INERIS)

Selim AIT-AISSA (INERIS)

Guide rédigé avec la contribution de

Azziz ASSOUMANI (INERIS)

Pascal PANDARD (INERIS)

Jean-Philippe GHESTEM (BRGM)

Nathalie GUIGUES (LNE)

Contact principal

Selim AIT-AISSA (selim.ait-aissa@ineris.fr)

Remerciements

Les auteurs remercient Olivier GEFFARD (INRAE), Valentin DUPRAZ (Régie de l'Eau – Bordeaux Métropole), Olivier PERCEVAL, Olivier CARDOSO et Camille DETREE (OFB) pour leur relecture critique du document.

Référence du document

AQUAREF – 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

Droits d'usage

Accès public

Avec le soutien de



MINISTÈRE
DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE,
DE LA BIODIVERSITÉ,
DE LA FORÊT, DE LA MER
ET DE LA PÊCHE

*Liberté
Égalité
Fraternité*



Table des matières

1	Préambule	5
2	Glossaire et définitions.....	7
3	Introduction et objectifs du guide.....	8
4	Mesure de l'activité œstrogénique par bioessai <i>in vitro</i> dans l'eau : de la préparation des échantillons à l'analyse des données	9
4.1	Échantillonnage et préparation des échantillons	10
4.1.1	Prélèvement sur le terrain et transport vers le laboratoire	12
4.1.2	Préparation des échantillons au laboratoire	12
4.2	Bioessais in vitro	14
4.2.1	Principe général	14
4.2.2	Bioessais existants et statut normatif.....	14
4.2.3	Réalisation des bioessais et détermination d'équivalents-œstradiol (E2-EQ)	16
4.2.4	Détermination de la limite de quantification	17
4.2.5	Critères de validité des essais	17
4.3	Contrôle de la qualité.....	17
4.3.1	Précautions d'usage.....	17
4.3.2	Blancs terrain et blancs de laboratoire.....	18
4.3.2.1	Blancs terrain	18
4.3.2.2	Blancs de laboratoire.....	18
4.3.3	Contrôles associés à la réalisation des bioessais	19
5	Rôles et responsabilités des acteurs/prestataires dans la chaîne de mesure de l'activité œstrogénique	19
6	Références.....	20
7	Liste des annexes.....	23

1 Préambule

Les guides AQUAREF regroupent les recommandations techniques d'AQUAREF pour la réalisation des opérations d'échantillonnage et d'analyse dans les programmes de surveillance chimique liés à la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et la directive-cadre « stratégie pour le milieu marin » (DCSMM). Ils portent sur les eaux superficielles (eau, sédiment, biote) continentales et marines, les eaux souterraines et les eaux résiduaires urbaines et industrielles. Ils intègrent les dispositions de l'arrêté « surveillance » du 26 avril 2022, de l'arrêté « agrément des laboratoires » du 26 juin 2023, de l'avis « limites de quantification » associé à celui-ci. Ils peuvent également être utilisés dans d'autres contextes de surveillance ou de diagnostic des milieux.

Les guides AQUAREF s'adressent aux opérateurs d'échantillonnage et d'analyse ainsi qu'aux maîtres d'ouvrages de prestations (demandeur) qui pourront utiliser les recommandations techniques pour élaborer leurs cahiers des charges.

Les recommandations techniques formulées sont basées sur l'état de l'art disponible à la date de rédaction, dont les retours d'expériences et les résultats des études AQUAREF. Elles visent à concilier l'objectif de fiabilité des données et la faisabilité opérationnelle de mise en œuvre. Les recommandations de ce guide s'appuient sur les textes réglementaires en vigueur au moment de sa rédaction. Il est conseillé aux laboratoires et aux demandeurs de veiller à disposer des dernières versions en vigueur de ces textes.

Les termes « recommande », « doit » ou « recommandation » utilisés dans les guides AQUAREF indiquent que les pratiques décrites sont indispensables pour la qualité des données in fine. Des pratiques alternatives peuvent être mises en œuvre s'il est démontré que celles-ci conduisent à des résultats équivalents à la pratique recommandée. Les termes « propose » ou « proposition » sont utilisés pour des préconisations complémentaires, non indispensables, visant à répondre à des exigences qualitatives accrues/renforcées.

Pour les dispositions techniques non indiquées dans ses guides, AQUAREF recommande de s'appuyer sur les normes et documents techniques de référence en vigueur.

Les guides AQUAREF n'ont pas de valeur réglementaire. Leur utilisation, intégrale ou partielle, est faite sous la seule et entière responsabilité de l'utilisateur.

Les concepts et les définitions nécessaires à la lecture des guides sont regroupés dans un document unique « Opérations d'échantillonnages et d'analyses physico-chimiques pour la surveillance des milieux aquatiques – Définitions ».

https://www.aquaref.fr/sites/default/files/medias/Definitions_echantillonnage_analyse_VF.pdf

Les codes SANDRE indiqués sont applicables à la date de publication, mais susceptibles d'évolution ultérieure. Il appartient à l'utilisateur de vérifier leur actualisation sur le site internet du sandre.

<http://www.sandre.eaufrance.fr/Rechercher-une-donnee-d-un-jeu>

Chaque guide est référencé par son année de mise à jour. La dernière version annule et remplace les versions précédentes.

Guides AQUAREF disponibles :

- [Guides techniques | AQUAREF](#)

Guides échantillonnage « milieu »

- [Guide des opérations d'échantillonnage d'eau en eau souterraine](#)
- [Guide des opérations d'échantillonnage d'eau en cours d'eau](#)
- [Guide des opérations d'échantillonnage d'eau en plan d'eau](#)
- [Guide des opérations d'échantillonnage de sédiments en milieu continental](#)
- [Guide des opérations d'échantillonnage en milieu marin \(eau, sédiment, biote\)](#)

Guide conditionnement transport « biote »

- [Conditionnement et transport des échantillons biote \(poisson\) en milieu continental \(cours d'eau – plan d'eau\)](#)

Guides analyse « milieu »

- [Guide des opérations d'analyse physico-chimique des eaux et des sédiments en milieu continental](#)
- [Guide des opérations d'analyse physico-chimique du biote en milieu continental](#)

Spécificité DROM

- [Opérations d'échantillonnage d'eau pour la surveillance des milieux aquatiques - Module spécifique DROM](#)

Guides eaux résiduaires

- [Guide technique opérationnel des pratiques d'échantillonnage et de conditionnement en vue de la recherche de micropolluants prioritaires et émergents en assainissement collectif et industriel](#)
- [Guide des opérations d'analyse physico-chimique des eaux résiduaires urbaines et industrielles dans le cadre des programmes de surveillance](#)

Guides Échantillonneurs intégratifs passifs

- [Opérations d'échantillonnage par échantillonneurs intégratifs passifs en cours d'eau et eau littorale dans le cadre des programmes de surveillance DCE](#)
- [Opérations d'analyse physico-chimique sur échantillonneurs intégratifs passifs \(EIP\) en cours d'eau et eau littorale dans le cadre des programmes de surveillance DCE](#)

2 Glossaire et définitions

Un certain nombre de termes, acronymes spécifiques à l'analyse par bioessais *in vitro* de l'activité œstrogénique sont utilisés et sont définis ici.

Bioessai <i>in vitro</i>	Essai biologique mené à l'aide de lignées cellulaires ou de levures en culture exprimant un gène rapporteur de l'activation du récepteur des œstrogènes par une substance chimique ou un échantillon.
Bioanalyse <i>in vitro</i>	Méthode/démarche basée sur l'utilisation de bioessais <i>in vitro</i> pour déterminer et quantifier l'activité œstrogénique de produits chimiques et d'échantillons environnementaux
E2	17 β -œstradiol
E2-EQ	Concentration de 17 β -œstradiol (E2) équivalente à l'activité œstrogénique mesurée dans un échantillon
EC ₁₀ , EC ₅₀	Concentration d'une substance ou d'un échantillon qui induit 10% ou 50% d'effet
EE2	17 α -éthinyloestradiol
ER	Récepteur des œstrogènes
Facteur d'enrichissement relatif (REF)	Facteur de dilution/concentration de l'échantillon qui prend en compte le facteur de concentration au cours de l'extraction et le facteur de dilution de l'extrait dans le bioessai. Le REF est indicateur de la concentration d'échantillon testée. Une valeur de REF de 10 correspond à l'échantillon initial 10 fois concentré. Une valeur de REF de 0,1 correspond à l'échantillon initial dilué 10 fois.

3 Introduction et objectifs du guide

La gestion durable des ressources en eau nécessite l'évaluation continue de la qualité de l'eau de surface afin d'identifier et de mieux comprendre les risques associés. La pollution chimique s'inscrit comme un contributeur significatif de la dégradation des écosystèmes aquatiques et de l'appauvrissement de la biodiversité. Une multitude de produits chimiques provenant de diverses sources naturelles et anthropiques aboutissent dans les écosystèmes aquatiques où ils peuvent subir plusieurs réactions de transformation biotiques et abiotiques, formant des mélanges complexes [1]. Parmi ces contaminants figurent les perturbateurs endocriniens (PE), qui représentent une large catégorie de molécules capables d'interférer avec le système endocrinien, à travers différents modes d'action, et d'induire des effets néfastes sur la santé des animaux et des humains. Le développement et la validation de stratégies permettant une bonne évaluation des PE en présence, de leurs niveaux de concentrations et de leurs impacts sur les écosystèmes aquatiques est aujourd'hui un enjeu majeur.

La surveillance environnementale des PE représente un défi important en raison de la grande diversité des familles chimiques qu'ils représentent et de la complexité des contaminations aquatiques. Il est désormais admis que la surveillance réglementaire de la qualité chimique des masses d'eau, telle que décrite par la Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE 2000/60/CE), ne donne qu'une image partielle de la contamination environnementale et du danger écotoxique associé. Cela est principalement dû au fait que cette approche se concentre sur une liste finie de substances prioritaires, négligeant la présence potentielle de milliers de contaminants inconnus ainsi que les effets de mélange. De plus, les normes de qualité environnementale (NQE) proposées pour certains composés de la liste de surveillance de la DCE, tels que les œstrogènes stéroïdiens, sont très basses (i.e. 17 et 180 pg L⁻¹ pour l'éthinylestradiol (EE2) et l'estradiol (E2), respectivement, exprimées en moyenne annuelle), ce qui constitue un défi analytique significatif et une limite pour leur surveillance en routine. Actuellement, peu de laboratoires en charge des analyses chimiques pour la surveillance de l'état chimique des milieux disposent de méthodes suffisamment sensibles pour atteindre ces seuils.

Dans ce contexte, la mise en œuvre de méthodes de détection bio-analytiques utilisant des bioessais *in vitro* basés sur un mode d'action endocrinien (i.e. interaction avec le récepteur des œstrogènes) a été établie comme étant une approche complémentaire pertinente pour relever les défis liés à la surveillance de la qualité chimique des eaux [2]. Contrairement à l'approche analytique conventionnelle, qui cible des substances individuelles, les outils bio-analytiques fournissent une information plus large sur l'activité œstrogénique de la matrice analysée en intégrant toutes les substances partageant un même mode d'action présentes dans un échantillon et en prenant en compte l'effet de mélange [3]. La performance de ces outils pour la surveillance chimique des hormones œstrogéniques dans les eaux de surface et les eaux usées a été démontrée dans différents programmes français [4] et européens [5], [6], en permettant une détection sensible, spécifique et quantitative (en quantité de équivalents-17β-œstradiol ou E2-EQ) à des seuils compatibles avec ceux requis par la DCE [7].

Ces outils sont aujourd'hui examinés pour être introduits dans la surveillance réglementaire en Europe, notamment dans le cadre des travaux du groupe d'experts *Effect-based Methods* (piloté par le JRC, sous-groupe du WG-Chemicals, sous l'égide de la DG-ENV) qui visent à définir les seuils à appliquer en surveillance réglementaire. En France, l'arrêté surveillance du 26 avril 2022 introduit le paramètre activité œstrogénique ou E2-EQ (code Sandre #8512) parmi les substances pertinentes à surveiller (SPAS) à partir de 2025 (catégorie C). Plus récemment, la révision de la DCE demande aux états membres de surveiller la présence de substances œstrogéniques dans les masses d'eau à l'aide de

méthodes de surveillance fondées sur les effets à compter du 1er janvier 2030 (UE 2026/805). Dans ce contexte, il existe un besoin de méthodes et également de recommandations nationales harmonisées pour l'évaluation de ce paramètre.

Aujourd'hui, il existe trois normes ISO pour l'analyse de l'activité œstrogénique d'échantillons d'eau à l'aide de 3 types de bioessais *in vitro* (NF EN ISO 19040-1 [8], NF EN ISO 19040-2 [9], NF EN ISO 19040-3 [10]). Par ailleurs la norme ISO 23196 traite spécifiquement du calcul des concentrations en équivalence biologique (BEQ) sur la base des résultats des bioessais *in vitro*. Ces normes sont applicables à des échantillons natifs et des extraits organiques. En effet, dans une très grande majorité de cas et en particulier pour les eaux de surface ou les eaux de boisson qui présentent des niveaux d'activité œstrogénique bas (< ng/L), il est indispensable de travailler sur un extrait organique concentré afin d'augmenter la sensibilité de la mesure à des niveaux de quantification compatibles avec les seuils réglementaires (cf. Annexe D de la norme NF EN ISO 19040-3).

Dans le présent guide, AQUAREF propose des recommandations techniques pour une mise en œuvre harmonisée des opérations d'échantillonnage, d'extraction, d'analyse et de traitement des données permettant la mesure d'activité œstrogénique dans l'eau par l'utilisation de bioessais *in vitro*. Ce guide vise à garantir la qualité des données nécessaire à leur exploitabilité.

Ce guide s'applique aux eaux de surface continentales et littorales et aux eaux usées.

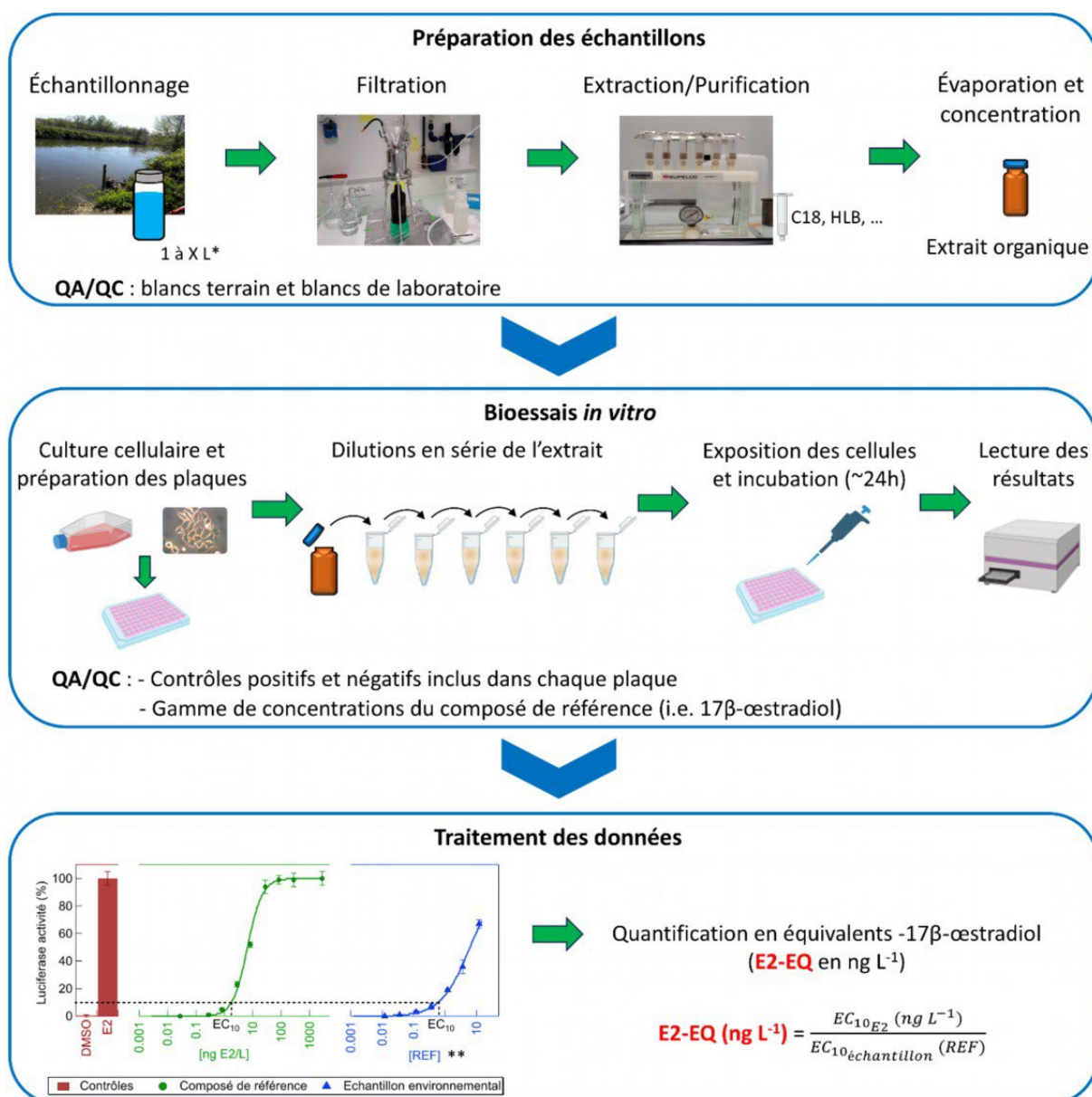
Le principe de la mesure *in vitro* d'activité œstrogénique a été décrite en détail dans un précédent rapport bibliographique [2]. Le présent guide formule différentes recommandations pratiques en matière d'opérations d'analyse, sur la base d'une méthodologie générique. En raison de la diversité des outils biologiques actuellement disponibles et de leur degré de maturité sur le plan normatif, ce guide ne peut prétendre à un caractère exhaustif. Un protocole basé sur l'utilisation d'une méthode spécifique est néanmoins présenté en Annexes 2 et 3, à titre d'exemple.

4 Mesure de l'activité œstrogénique par bioessai *in vitro* dans l'eau : de la préparation des échantillons à l'analyse des données

La Figure 1 présente, dans leur principe, les différentes étapes du processus à mettre en œuvre pour la mesure de l'activité œstrogénique par bioessai *in vitro*. Trois grandes étapes techniques sont à considérer : 1) la phase d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon, 2) la réalisation du bioessai en lui-même et enfin 3) le traitement des données.

Dans ce chapitre, nous décrivons chaque partie, de façon générique. Des exemples de protocoles détaillés sont présentés en Annexes 1, 2 et 3. Le volet assurance et contrôle de la qualité (QA/QC) associé à chaque partie est présenté en fin de chapitre (§4.3.).

La démarche présentée peut s'appliquer aux eaux de surfaces continentales, eaux littorales et eaux usées.



* Volume défini par le contexte de l'étude (ou le type d'échantillon)

** REF = facteur d'enrichissement relatif qui prend en compte l'enrichissement au cours de l'extraction jusqu'à la dilution dans le bioessai

Figure 1 : Principales étapes de la mesure et de l'interprétation d'activité œstrogénique dans l'eau

4.1 Échantillonnage et préparation des échantillons

L'échantillonnage et la préparation de l'échantillon en vue de son analyse par un bioessai sont des phases cruciales de ce processus car elles conditionnent la qualité de la bioanalyse, tant en termes d'intégrité de l'échantillon que de sensibilité de la bioanalyse. Elles se déroulent en plusieurs étapes successives, décrites de façon synthétique dans le Tableau 1 suivant et commentées par la suite.

Tableau 1. Principales étapes méthodologiques de la préparation d'échantillon d'eau en vue de leur bioanalyse *in vitro* : synthèse des objectifs et des recommandations

Étape	Objectif	Recommandations	Options
Échantillonnage et transport vers le laboratoire	Prélever un volume d'eau (≥ 1 L) et le transférer rapidement au laboratoire à 5 ± 3 °C. Risque : dégradation des hormones, contamination de l'échantillon par l'opérateur	Porter des gants en nitrile Volume minimal : 1 L Conservation toujours à 4 °C et transport (<24 h) vers le laboratoire Flaconnage : verre ou inox ou HDPE (Nalgene™), préalablement rincé à l'eau du site à prélever	Possibilité d'acidifier l'échantillon (e.g. ajout de H₂SO₄ 3 M à une concentration finale de 0,1 % v/v, pH≈3) pour éviter la dégradation des hormones [5], [11]
Filtration	Focaliser l'analyse sur la phase organique dissoute, qui contient majoritairement les hormones, éliminer de potentiels interférents matriciels liés aux MES et éviter un colmatage des cartouches SPE dans le cas d'échantillons riches en MES	Filtrer à réception et avant toute congélation éventuelle Filtration GF/F (0,7 µm) Si échantillon très chargé en MES (e.g. eau usée), filtration sur GF/A (1,6 µm) puis GF/F	-
Extraction	Concentrer les contaminants organiques dissous par extraction sur phase solide (SPE). Élution par des solvants organiques à large spectre de polarité (e.g. mélange dichlorométhane/méthanol et reconstitution de l'extrait final dans le méthanol pour conservation)	Utiliser une phase avec le spectre d'adsorption le plus large possible : HLB ou HR-X [11]. NB (hors cadre arrêté surveillance): Si focus sur les hormones œstrogéniques : phase C18 + clean-up [5].	Extraction sur cartouches (e.g. Oasis™ HLB) ou sur SPE-DISK.
Reconstitution de l'extrait final	Reprendre l'extrait dans un solvant organique compatible avec les bioessais. Le volume de reprise doit permettre un facteur de concentration maximal tout en assurant une bonne solubilisation de l'extrait sec.	Le choix du solvant de reprise dépend des conditions de réalisation des bioessais par le laboratoire. Classiquement, le DMSO est utilisé mais le méthanol ou l'éthanol peuvent également l'être pour certains tests (e.g. GeneBlazer, YES).	L'extrait organique peut être conservé à -20°C (maximum 2 mois) en vue d'une réalisation ultérieure des bioessais

4.1.1 Prélèvement sur le terrain et transport vers le laboratoire

La méthodologie décrite dans ce guide se base sur un échantillon d'eau brute, prélevé de manière ponctuelle ou composite, tel que décrit en détail dans le Guide des opérations d'échantillonnage d'eau en cours d'eau | AQUAREF [12]. Un flaconnage en verre, inox ou polyéthylène haute densité (HDPE), préalablement rincé à l'eau du site, doit être utilisé. Il est à noter que les échantillonneurs passifs sont également compatibles avec l'analyse par bioessai *in vitro* mais ne sont pas considérés dans ce document.

De manière générale, des précautions particulières doivent être prises pour éviter toute contamination de l'échantillon au cours du prélèvement (cf. recommandations dans le Tableau 1 et dans le Guide Echantillonnage). Des blancs terrains sont à inclure dans le plan d'échantillonnage (cf. §4.3.2.). Les échantillons d'eau doivent ensuite être transportés à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et livrés au laboratoire le plus rapidement possible, idéalement sous 24 h, pour éviter une dégradation des hormones ; si ce délai n'est pas tenable, le transport vers le laboratoire doit être réalisé dans un délai maximum de 3 jours après le prélèvement et le dépassement notifié.

Le volume d'eau à considérer pour l'analyse dépend du facteur de concentration ciblé et de la sensibilité intrinsèque du bioessai utilisé (i.e. concentration en E2 dans le test induisant 10 % d'effet). Cet échantillon subissant ensuite une étape d'extraction et de concentration, le volume d'échantillon initial conditionnera la limite de quantification d'E2-EQ par le bioessai. Ce volume est au minimum d'un litre pour les eaux de surface. Cependant, il est recommandé de travailler sur un volume d'eau plus important (e.g. jusqu'à 5 L) pour augmenter la sensibilité de la détection notamment dans le cas d'échantillons plus dilués comme les eaux littorales [4].

4.1.2 Préparation des échantillons au laboratoire

Filtration

L'étape de filtration vise à éliminer les matières en suspension qui peuvent interférer avec le processus d'extraction (e.g. colmatage des colonnes SPE). Cette étape est indispensable dans le cas de matrices chargées en MES (e.g. eaux usées) mais une analyse de la littérature montre qu'elle n'est pas réalisée systématiquement en ce qui concerne les eaux de rivière peu chargées en matière en suspension. Par souci d'homogénéité dans le traitement des échantillons, il est recommandé de l'inclure systématiquement, tout particulièrement lorsqu'une extraction sur colonne SPE est utilisée (cf. paragraphe suivant).

Les échantillons sont filtrés à leur arrivée au laboratoire. En particulier si l'échantillon ne peut pas être traité dans les 3 jours et doit être congelé avant analyse, **il est impératif de le filtrer avant congélation**, pour éviter une déstructuration de la matière organique à la décongélation et une modification de la nature chimique de l'échantillon.

La filtration est réalisée à l'aide de filtres en fibre de verre (GF/F) préalablement calcinés ($> 400^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 5 heures) de taille de pores de $0,7\ \mu\text{m}$. Dans le cas de matrices très chargées en MES (e.g. eau usée), une filtration en deux étapes, avec une première filtration sur filtre GF/A à $1,6\ \mu\text{m}$ suivie d'une filtration à $0,7\ \mu\text{m}$, peut s'avérer nécessaire.

Note. Dans cette première version du guide, l'option d'analyse sur filtré a été prise pour simplifier l'étape d'extraction et dans la mesure où le paramètre 8512 fait partie des SPAS, paramètres pour lesquels les exigences DCE ne s'appliquent pas directement. Cependant, l'introduction récente de trois hormones dans la liste des substances prioritaires (substances pour lesquelles il existe par

défaut une exigence d'analyse sur la fraction brute) et de la surveillance des substances œstrogéniques par bioessais dans une étude comparative au titre de la DCE nécessitera de réétudier cette position nationale en fonction des besoins de comparaison des résultats ciblés sur les hormones et des résultats de bioessais pour la surveillance des substances œstrogéniques. Dans le cas où in fine il serait décidé de travailler sur l'échantillon brut, les méthodes d'extraction de type SPE DESK seraient notamment recommandées.

Extraction sur phase solide (SPE)

L'objectif de l'étape est d'extraire et de concentrer les substances organiques présentes dans l'échantillon d'eau pour optimiser leur détection par les bioessais.

La méthode privilégiée pour extraire les substances organiques présentant une activité œstrogénique dans les eaux est l'extraction en phase solide (SPE)¹. Dans son principe, la SPE repose sur l'utilisation d'une phase solide (adsorbant) sur laquelle se fixent les composés organiques présents dans l'eau qui ont une affinité pour cette phase. Ces molécules sont ensuite éluées par un solvant organique puis concentrées par l'évaporation du solvant. Un exemple de protocole détaillant les quantités de phase et de solvant à utiliser par volume d'échantillon est présenté en Annexe 1.

L'enjeu de cette étape est d'utiliser une phase qui présente un spectre d'extraction le plus exhaustif possible afin de prendre en compte une gamme de molécules la plus large possible en matière de polarité. Typiquement, les phases du type *hydrophilic-lipophilic balance* (HLB, copolymère de divinylbenzène et N-vinylpyrrolidone) ou HR-X (copolymère de polystyrène-divinylbenzène) sont les plus adaptées [11]. La phase C18, typiquement utilisée pour l'analyse chimique des hormones œstrogéniques, couplée à une étape de nettoyage (« clean-up »), peut être également adaptée pour la bio-détection spécifique des hormones 17 β -œstradiol (E2), 17 α -éthinyloœstradiol (EE2), œstrone (E1) et œstriol (E3) en alternative à l'analyse chimique par spectrométrie de masse à haute résolution [5]. Toutefois, étant plus sélective que les phases HLB ou HR-X, la phase C18 pourrait être un peu moins performante pour l'extraction de substances œstrogéniques non stéroïdiennes, comme par exemple les bisphénols ou les alkylphénols [11]. Dans le cadre de ce guide et de l'application de l'arrêté de surveillance du 26/04/2022, il est donc recommandé d'utiliser préférentiellement les phases HLB ou HR-X pour cette étape.

Les échantillons sont concentrés par extraction, laquelle doit être réalisée juste après la filtration. **Si l'extraction ne peut être effectuée le jour même de la filtration, le filtrat doit être conservé à +4 °C pendant un jour au maximum. Si cela n'est pas possible, les échantillons filtrés peuvent être congelés à -20 °C et extraits plus tard.** Dans le cadre d'une campagne de mesures, il est recommandé que les mêmes modalités de prise en charge soient appliquées pour tous les échantillons.

Évaporation et reprise dans un solvant compatible avec les bioessais

Après l'extraction, l'extrait sec est dissous dans un solvant organique compatible avec la réalisation des bioessais. Généralement, l'extrait est évaporé jusqu'à sec, puis reconstitué dans du méthanol (MeOH) ou du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le choix du solvant de reprise dépend des conditions de réalisation du bioessai par le laboratoire, qui peuvent être spécifiques des conditions d'exposition ou du bioessai lui-même. Par exemple, le DMSO est couramment utilisé dans une majorité de tests cellulaires mais le MeOH peut l'être également pour certains tests qui incluent une étape d'évaporation

¹ La méthode d'extraction liquide-liquide (LLE) peut également être utilisée, si le contexte l'exige. Toutefois, son utilisation est moins courante en raison des volumes élevés de solvants consommés et de sa lourdeur.

du solvant avant mise en contact avec les cellulés e.g. GeneBlazer, YES). Le volume de solvant de reprise doit permettre un facteur d'enrichissement relatif (REF) maximal tout en assurant une bonne solubilisation de l'extrait sec (extrait visuellement homogène, sans particules résiduelles). Le REF correspond au rapport entre la concentration finale testée dans le bioessai (incluant le facteur de concentration pendant la phase de préparation et de dilution au cours de l'essai) et la concentration dans l'échantillon initial. Typiquement, pour une eau de surface, il est conseillé de tester en première intention une gamme de concentrations allant de 0,1 à 20 REF dans le bioessai (cf. exemple en Annexe 3).

4.2 Bioessais *in vitro*

4.2.1 Principe général

Dans leur principe, les bioessais *in vitro* utilisés pour la détection d'activité œstrogénique sont tous basés sur le mode d'action des œstrogènes, c'est-à-dire leur capacité à se lier au récepteur des œstrogènes (ER) et à activer l'expression de gènes cibles de ce récepteur.

Les bioessais *in vitro* considérés dans ce guide fonctionnent tous selon le même principe : il s'agit de modèles cellulaires humains (e.g. ER-CALUX, MELN) ou de levure (e.g. L-YES, A-YES) exprimant de façon stable un gène rapporteur placé sous le contrôle transcriptionnel du récepteur des œstrogènes alpha (ER α) humain. L'intérêt d'utiliser un système avec gène rapporteur est qu'il permet une détection spécifique et sensible de l'activation du récepteur, par des techniques relativement simples et utilisées en routine (mesure de luminescence, fluorescence ou photométrie à l'aide de lecteurs de microplaques). La réponse du gène rapporteur ainsi quantifiée est directement proportionnelle à la concentration en substances œstrogéniques actives présentes dans le milieu d'essai.

4.2.2 Bioessais existants et statut normatif

Le Tableau 2 dresse une liste non exhaustive de bioessais *in vitro* disponibles et qui ont fait l'objet de procédures de standardisation et de validation. Ces bioessais sont tous basés sur le récepteur des œstrogènes alpha (ER α) humain couplé à un gène rapporteur. Ils sont tous applicables dans le cadre de la mise en œuvre de ce guide.

Tableau 2. Exemples de bioessais *in vitro* de mesure de l'activité œstrogénique basés sur des cellules humaines ou de levure et leur statut normatif/de validation

Bioessai <i>in vitro</i>	Cellule/gène rapporteur	Texte normatif	Comparaison inter-laboratoires
Lyticase Yeast estrogenic screen (L-YES)	Cellules de levure/ β Galactosidase	NF EN ISO 19040-1 [8]	ISO 19040, [6]
<i>Arxula</i> -yeast estrogen screen (A-YES)	Cellules de levure/phytase	NF EN ISO 19040-2 [9]	ISO 19040, [13]
YES	Cellules de levure/ β Galactosidase	-	[6], [14], [15]
ER α -CALUX®	Cellules humaines U2OS/Luciférase	NF EN ISO 19040-3 [10]	ISO 19040, [5], [6], [14], [15]
MELN	Cellules humaines MCF7/Luciférase	NF EN ISO 19040-3 [10]	[5], [6], [14], [15]
hER α -HeLa-9903	Cellules humaines HeLa/Luciférase	OECD 455 [16] NF EN ISO 19040-3* [10]	OECD 455, [5], [6]
HELN-ER α	Cellules humaines HeLa/Luciférase	NF EN ISO 19040-3* [10]	-
T47D-kbLuc	Cellules humaines T47D/Luciférase	NF EN ISO 19040-3* [10]	[14], [15]
VM7Luc4E2	Cellules humaines MCF7/Luciférase	OECD 455 [16]	OECD 455
ER-GeneBlazer	Cellules humaines HEK293T/FRET (fluorescence)	-	[5], [6], [14]

* Bioessai mentionné dans l'Annexe C de la norme citée comme étant potentiellement utilisable sous réserve qu'il remplisse les critères de validité décrits

Une condition importante à la mise en œuvre des bioessais *in vitro* de transactivation des récepteurs des œstrogènes dans la surveillance de la qualité de l'eau est la disponibilité de méthodes d'essai standardisées. Les bioessais listés dans le Tableau 2 présentent différents degrés de validation, allant de la normalisation dans un contexte international (ISO, OCDE) aux études de comparaison inter-laboratoires impliquant des équipes internationales expertes en bioanalyse des œstrogènes.

La norme NF EN ISO 19040 établit le cadre pour la détermination du potentiel œstrogénique des eaux naturelles et des eaux usées. Elle couvre l'ensemble du processus expérimental, y compris l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la culture cellulaire, les bioessais et l'analyse des données. Les trois parties de cette norme ISO initialement publiées en 2018 (NF EN ISO 19040 1–3 [8], [9], [10]) ont également été reconnues comme des normes françaises (NF) et européennes (EN) en 2022. Ces normes concernent la validation des bioessais L-YES, A-YES, ER α -CALUX et MELN et mentionnent également la possibilité d'étendre la méthode à d'autres bioessais cellulaires (T47D-kbLuc, hER α -HeLa-9903, HELN-ER α).

Si la validation ISO est réalisée avec des échantillons environnementaux, la validation OCDE est réalisée avec des substances chimiques pures uniquement. Cela concerne les bioessais HeLa 9903 et VM7Luc4E2 qui ont fait l'objet de validation inter-laboratoires dans ce contexte OCDE (OCDE 455).

Le bioessai HeLa 9903 a néanmoins été éprouvé dans des études inter-laboratoires visant à quantifier l'activité œstrogénique d'eaux de surface et d'eaux usées [5], [6], au même titre que les bioessais MELN, T47D-kbLuc, ER-GeneBlazer ou p-YES qui ne font pas l'objet d'une norme spécifique. Ces études ont démontré les performances équivalentes de ces différents bioessais en matière de quantification de l'activité œstrogénique dans ces matrices au regard des analyses chimiques réalisées par spectrométrie de masse en haute résolution (HR-MS) et de sensibilité requise pour couvrir les seuils de détection requis (cf. Annexe 4).

D'une manière générale, si seule une partie des bioessais répertoriés a fait l'objet d'une norme, les données de validation disponibles dans la littérature scientifique et dans les dossiers normatifs montrent que ces différents bioessais sont à ce stade considérés comme équivalents et utilisables pour la surveillance du paramètre SANDRE 8512. **Dans tous les cas, la limite de quantification doit être explicitement vérifiée dans les conditions de laboratoire dans lesquelles l'analyse est réalisée et couvrir effectivement le seuil de quantification requis.** Ce seuil peut être atteint en jouant sur le facteur de concentration de l'échantillon.

4.2.3 Réalisation des bioessais et détermination d'équivalents-œstradiol (E2-EQ)

Des exemples de protocoles de réalisation d'un bioessai (MELN) et de détermination d'E2-EQ sont présentés respectivement en Annexes 2 et 3.

D'une manière générale, les essais sont réalisés en microplaques de culture (96 ou 384 puits), chaque plaque incluant un contrôle négatif (exposition des cellules au solvant seul), un contrôle positif (E2 à une concentration induisant un effet maximal) et une gamme de dilutions de l'échantillon à tester. Après exposition des cellules (en général 16 à 24 h selon la lignée cellulaire), le signal de la protéine rapporteur est mesuré (en unité de luminescence, de fluorescence ou d'absorbance, selon le bioessai) à l'aide d'un lecteur de microplaque approprié et est exprimé en pourcentage par rapport au contrôle positif (E2) inclus dans chaque plaque.

Un échantillon est considéré comme actif si au moins deux concentrations consécutives ou la concentration la plus forte induisent une activité supérieure à 10 %. Tout échantillon positif doit être confirmé au moins une fois au cours d'un second essai indépendant, incluant l'ensemble des contrôles négatifs et positifs. Les échantillons ne présentant pas d'activité peuvent n'être testés qu'une seule fois, sous réserve que l'essai remplisse les critères d'acceptabilité décrits ci-après (§4.2.5.).

Les données ainsi obtenues sont utilisées pour déterminer la concentration en E2-EQ dans l'échantillon. On pourra s'appuyer sur la norme ISO 23196 qui traite spécifiquement du calcul des concentrations en équivalence biologique (BEQ) sur la base des résultats des bioessais *in vitro*, le paramètre E2-EQ étant un cas de BEQ pour l'activité œstrogénique.

De façon générique, pour quantifier une activité œstrogénique dans un échantillon actif, il est impératif de réaliser une gamme de dilutions de cet échantillon afin d'établir une **courbe concentration-réponse** qui permettra de déterminer la **concentration en échantillon induisant 10 % d'effet** (EC₁₀). Celle-ci est obtenue par la modélisation des données expérimentales à l'aide d'un modèle à 4 ou 5 paramètres (e.g. modèle log-logistique ou modèle de Hill). Pour permettre une détermination robuste de l'EC₁₀, la gamme de dilutions de l'échantillon doit inclure plusieurs concentrations sans effet et au moins deux concentrations avec un effet supérieur à 10 %, afin d'encadrer l'EC₁₀. Différents logiciels de modélisation peuvent être utilisés pour modéliser les courbes concentration-réponse (R, GraphPad, RegTox Microsoft Excel™ [17]...). Un exemple de modélisation de courbe concentration-réponse est présenté en Annexe 3.

La concentration exprimée en équivalents-17β-œstradiol (E2-EQ) est ensuite déterminée comme étant le rapport entre l'EC₁₀ de l'œstradiol (E2, contrôle positif), exprimée en ng L⁻¹, et l'EC₁₀ de l'échantillon qui correspond au facteur d'enrichissement relatif (REF) induisant 10% de réponse, selon l'équation (1):

$$E2 - EQ \text{ (ng/L)} = \frac{EC_{10E2} \text{ (ng/L)}}{EC_{10\text{échantillon}}} \quad (1)$$

4.2.4 Détermination de la limite de quantification

Dans le cas d'un échantillon non actif, la limite de quantification (LQ) en E2-EQ (ng/L) est définie selon l'équation (2) :

$$LOQ = \frac{EC_{10E2} (ng/L)}{REF \text{ maximal testé}} \quad (2)$$

Dans le cas d'un échantillon positif et de la réalisation d'un blanc terrain en parallèle (cf. §4.3.2.), si ce dernier est actif, il doit être quantifié pour déterminer sa valeur d'E2-EQ. Dans ce cas, l'échantillon n'est considéré actif que si cette valeur est 3 fois supérieure à celle du blanc terrain.

4.2.5 Critères de validité des essais

Le résultat d'un essai est valide si :

- L'EC₅₀ du composé de référence (E2) est comprise entre 1,6 et 34 pmol/L, selon la norme NF EN ISO 19140-3. Typiquement, pour le bioessai MELN présenté en Annexe 2, l'EC₅₀ est généralement comprise entre 8 et 40 pmol/L.
- Le taux d'induction entre le contrôle positif et le contrôle négatif est supérieur au taux d'induction attendu pour un bioessai donné (varie selon le bioessai utilisé, en général entre 3 et 10).

Si les critères d'acceptabilité de l'essai sont valides, le résultat de l'analyse d'un échantillon est valide s'il n'y a pas de phénomène d'interférence ou de cytotoxicité², i.e. se traduisant par une inhibition du signal aux plus fortes concentrations en échantillon. Si une inhibition du signal est observée, des concentrations plus faibles de l'échantillon doivent être réalisées et testées afin de déterminer la concentration maximale testée sans effet cytotoxique. Seules les concentrations sans effet cytotoxique pour les cellules sont alors considérées pour déterminer une valeur d'E2-EQ.

4.3 Contrôle de la qualité

L'ensemble du processus expérimental, de l'échantillonnage à la bioanalyse, implique de nombreuses manipulations susceptibles de contaminer les échantillons. Pour minimiser ce risque autant que possible, plusieurs précautions d'usage doivent être mises en œuvre. Il est également nécessaire d'effectuer différents blancs et contrôles pour garantir la qualité et la fiabilité des résultats rapportés.

4.3.1 Précautions d'usage

D'une manière générale, les matières plastiques doivent être évitées autant que possible lors du traitement des échantillons et de la préparation des extraits afin d'éviter toute contamination par des substances actives telles que les plastifiants. Autant que possible, il convient d'utiliser du matériel de laboratoire en verre et en acier inoxydable.

² Les échantillons analysés étant des matrices complexes, des éléments matriciels peuvent parfois interférer avec la réponse des bioessais cellulaires et se manifester par une augmentation ou une réduction du signal, de façon indépendante d'une action directe sur le récepteur nucléaire. Ces interférences matricielles, non spécifiques d'un mode d'action endocrinien, peuvent résulter par exemple d'interactions directes des composants de l'échantillon avec l'activité enzymatique rapportrice ou encore de phénomènes de (sub)cytotoxicité conduisant à une inhibition du signal. Une mesure de la viabilité cellulaire par différents tests (e.g. MTT) peut être réalisée pour confirmer une apparition de cytotoxicité.

Tous les équipements doivent être soigneusement nettoyés afin d'éviter toute contamination de fond. La verrerie doit être lavée et pyrolysée ($T > 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 5 heures). Si la pyrolyse n'est pas possible, la verrerie doit être rincée avec au moins deux solvants organiques de polarités différentes (par exemple, acétate d'éthyle, acétonitrile, acétone – éviter le méthanol pour les étapes de rinçage). La dernière étape de rinçage doit être effectuée avec un solvant de haute pureté, de préférence de qualité LC/MS.

Le lavage et la procédure de rinçage ci-dessus doivent également être appliqués à tout équipement qui ne peut pas subir de pyrolyse.

4.3.2 Blancs terrain et blancs de laboratoire

Des contrôles qualité de type « blancs » sont importants pour s'assurer que l'activité œstrogénique observée n'est pas due à une contamination à un stade quelconque de l'ensemble de l'approche expérimentale (de l'échantillonnage à l'analyse). Pour ce faire, différents types de blancs doivent être générés.

4.3.2.1 Blancs terrain

Des blancs terrain (BT) doivent être réalisés et analysés systématiquement lors de chaque campagne d'échantillonnage afin d'évaluer une possible contamination des échantillons au cours des prélèvements et du transport au laboratoire. Idéalement il faudrait réaliser un BT par jour d'échantillonnage et/ou par site d'échantillonnage et/ou par équipe préleveur, à définir en fonction du contexte de l'étude et des moyens disponibles.

Un blanc terrain est un échantillon d'eau non contaminée (e.g. eau de qualité LC/MS, eau d'Evian en bouteille en verre) qui a suivi exactement le même processus que les échantillons réels, depuis le prélèvement sur site (e.g. système de prélèvement, transport, stockage, etc.) jusqu'au traitement final au laboratoire (i.e. filtration, extraction, évaporation, concentration et analyse).

Si l'eau de qualité LC/MS ou de l'eau d'Evian n'est pas disponible, de l'eau ultrapure (e.g. MilliQ) ou une autre eau distillée peut être utilisée. Cependant, il convient toutefois d'être vigilant car les filtres MilliQ, particulièrement lorsqu'ils sont neufs, peuvent libérer des produits chimiques actifs dans certains bioessais.

4.3.2.2 Blancs de laboratoire

En plus du blanc terrain, des blancs de procédure doivent être générés pour chaque série de filtration ou extraction afin de s'assurer que la procédure expérimentale au laboratoire n'a pas conduit à une contamination. Si le blanc terrain s'avère contaminé, les blancs de filtration et les blancs d'extraction doivent alors être analysés afin d'identifier la (les) source(s) de contamination. Si le blanc terrain est négatif, il n'est pas utile de tester les blancs de laboratoire. En l'absence de blanc terrain, il est impératif de tester les blancs de laboratoire.

Pour générer un blanc de filtration, il est nécessaire de filtrer, en utilisant le même dispositif de filtration, 1 L d'eau ultrapure (qualité LC/MS ou Evian) et de préparer un extrait à partir du filtrat obtenu en utilisant le même processus de préparation que les échantillons.

Les blancs d'extraction sont générés par l'extraction d'une cartouche SPE vierge qui a été conditionnée, séchée et éluée pour générer un extrait, exactement de la même manière qu'avec un échantillon réel.

Ce type de blanc permet notamment de mettre en évidence une éventuelle contamination liée aux solvants ou au matériel d'extraction utilisés

4.3.3 Contrôles associés à la réalisation des bioessais

Pour garantir la qualité et la fiabilité des résultats des bioessais, ceux-ci doivent répondre à un certain nombre de critères d'acceptabilité. Ces critères peuvent différer en fonction des bioessais utilisés mais doivent dans tous les cas informer sur la sensibilité et la réactivité attendues du bioessai en question. Pour cela, plusieurs contrôles doivent être mis en œuvre :

- **Contrôles positifs et négatifs inclus dans chaque plaque** : Chaque plaque doit comprendre un contrôle positif (i.e. 17 β -estradiol à une concentration induisant une réponse maximale) et un contrôle négatif (i.e. milieu de culture contenant uniquement le solvant). Le contrôle positif confirme la réactivité attendue du bioessai, en vérifiant l'induction maximale attendue pendant le test (dépendante du bioessai utilisé), tandis que le contrôle négatif vérifie l'absence de réponse du bioessai en condition non stimulée.
- **Vérification de la sensibilité du bioessai au composé de référence (contrôle positif)** : au cours de chaque série d'analyse (par jour), une gamme de concentrations du composé de référence (i.e. 17 β -œstradiol) doit être réalisée, suivant une courbe concentration-réponse complète avec au moins sept concentrations couvrant a minima deux concentrations sans effet et deux concentrations induisant un effet maximal (cf. exemple de courbe concentration-réponse en Annexe 3). Ce contrôle permet de déterminer son EC50 et ainsi de vérifier la sensibilité du bioessai le jour de l'essai.

5 Rôles et responsabilités des acteurs/prestataires dans la chaîne de mesure de l'activité œstrogénique

Les étapes initiales de la chaîne de mesure de l'activité œstrogénique *in vitro*, comme l'échantillonnage, la gestion des échantillons, ou la préparation d'échantillons préalable à la bioanalyse, sont identiques à celles d'une analyse chimique classique pour les contaminants organiques. Techniquement, ces compétences existent auprès des laboratoires prestataires d'analyses environnementales. La réalisation des bioessais fait appel à des techniques comme la culture cellulaire ou les tests biochimiques. Ces compétences techniques sont usuelles dans les laboratoires de toxicologie environnementale.

Aujourd'hui, il existe relativement peu d'acteurs français, publics ou privés, qui réalisent et proposent en prestation l'ensemble de la chaîne de mesure, depuis l'échantillonnage jusqu'à la réalisation et l'interprétation des bioessais. Toutefois, il n'existe pas de verrous techniques identifiés qui feraient obstacle à un déploiement de ces techniques pour une utilisation en routine dans les laboratoires d'analyse.

Le tableau 3 présente des exemples de disponibilité commerciale des bioessais évoqués dans ce guide, depuis la disponibilité du matériel biologique à sa mise en œuvre dans une démarche bioanalytique complète.

Tableau 3. Disponibilité commerciale de bioessais in vitro et offres de prestation de bioanalyse d'échantillons environnementaux (liste non exhaustive ; « - » : information non connue)

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	-	Oui	-	-
A-YES	-	Oui	-	-

6 Références

- [1] Z. Wang, G. W. Walker, D. C. G. Muir, et K. Nagatani-Yoshida, « Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, n° 5, p. 2575-2584, mars 2020, doi: 10.1021/acs.est.9b06379.
- [2] S. Aït-Aïssa et N. Creusot, « Validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales - Revue bibliographique - », Rapport AQUAREF, 2015.
- [3] B. I. Escher, H. M. Stapleton, et E. L. Schymanski, « Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment », *Science*, vol. 367, n° 6476, p. 388-392, janv. 2020, doi: 10.1126/science.aay6636.
- [4] S. Aït-Aïssa, C. Chardon, et F. Brion, « Surveillance prospective - Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques | AQUAREF - Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques », 2020. Consulté le: 4 juin 2025. [En ligne]. Disponible sur: [Surveillance prospective - Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques | AQUAREF](#)
- [5] S. Könemann *et al.*, « Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 102, p. 225-235, mai 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.02.008.
- [6] L. Gómez *et al.*, « Estrogenicity of chemical mixtures revealed by a panel of bioassays », *Science of The Total Environment*, vol. 785, p. 147284, sept. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147284.
- [7] M. Carere *et al.*, « An integrated approach for chemical water quality assessment of an urban river stretch through Effect-Based Methods and emerging pollutants analysis with a focus on genotoxicity », *Journal of Environmental Management*, vol. 300, p. 113549, déc. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113549.
- [8] NF EN ISO 19040-1:2018, *Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (Saccharomyces cerevisiae)*.
- [9] NF EN ISO 19040-2:2018, *Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, Arxula adenivorans)*.
- [10] NF EN ISO 19040-3:2018, *Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay*.

- [11] T. Schulze *et al.*, « A guidance for the enrichment of micropollutants from wastewater by solid-phase extraction before bioanalytical assessment », *Environ Sci Eur*, vol. 36, n° 1, p. 165, sept. 2024, doi: 10.1186/s12302-024-00990-x.
- [12] B. Lepot, N. Marescaux, J.-P. Ghestem, M. Coquery, et N. Guigues, « Guide des opérations d'échantillonnage d'eau en cours d'eau | AQUAREF », Rapport AQUAREF, 2023. Consulté le: 19 février 2026. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.aquaref.fr/fr/espace-documentaire/guide-technique/guide-des-operations-dechantillonnage-deau-en-cours-deau>
- [13] K. Hettwer *et al.*, « Validation of Arxula Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study », *Science of The Total Environment*, vol. 621, p. 612-625, avr. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.211.
- [14] P. Y. Kunz *et al.*, « Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays », *Water Research*, vol. 110, p. 378-388, mars 2017, doi: 10.1016/j.watres.2016.10.062.
- [15] F. D. L. Leusch *et al.*, « Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, n° 10, p. 3853-3860, mai 2010, doi: 10.1021/es903899d.
- [16] OECD 455 : 2021, *Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 16 juin 2021. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- [17] E. Vindimian, C. Robaut, et G. Fillion, « A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. », *J Appl Biochem*, vol. 5, n° 4-5, p. 261-268. Freely available at: https://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html, août 1983.
- [18] P. Balaguer *et al.*, « Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens », *Science of The Total Environment*, vol. 233, n° 1, p. 47-56, août 1999, doi: 10.1016/S0048-9697(99)00178-3.
- [19] P. Y. Kunz, C. Kienle, M. Carere, N. Homazava, et R. Kase, « In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 106, p. 107-115, mars 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2014.11.018.
- [20] B. I. Escher *et al.*, « Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive », *Science of The Total Environment*, vol. 628-629, p. 748-765, juill. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.340.
- [21] P. A. Neale, B. I. Escher, M. L. de Baat, J. Enault, et F. D. L. Leusch, « Effect-Based Trigger Values Are Essential for the Uptake of Effect-Based Methods in Water Safety Planning », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 42, n° 3, p. 714-726, 2023, doi: 10.1002/etc.5544.
- [22] R. van der Oost, G. Sileno, M. Suárez-Muñoz, M. T. Nguyen, H. Besselink, et A. Brouwer, « SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 36, n° 9, p. 2385-2399, 2017, doi: 10.1002/etc.3836.
- [23] R. Kase *et al.*, « Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 102, p. 343-358, mai 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.02.013.
- [24] F. Brion *et al.*, « Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values », *Environment International*, vol. 130, p. 104896, sept. 2019, doi: 10.1016/j.envint.2019.06.006.

- [25] S. Finckh *et al.*, « Endocrine disrupting chemicals entering European rivers: Occurrence and adverse mixture effects in treated wastewater », *Environment International*, vol. 170, p. 107608, déc. 2022, doi: 10.1016/j.envint.2022.107608.
- [26] L. Gómez *et al.*, « Effect-based methods and effect-based trigger values for estrogenicity monitoring in surface water: an interlaboratory study », *Environmental Research*, vol. 298, p. 124218, juin 2026, doi: 10.1016/j.envres.2026.124218.
- [27] B. Jarošová, L. Bláha, J. P. Giesy, et K. Hilscherová, « What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? », *Environment International*, vol. 64, p. 98-109, mars 2014, doi: 10.1016/j.envint.2013.12.009.
- [28] M. A. K. Hashmi, B. I. Escher, M. Krauss, I. Teodorovic, et W. Brack, « Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia », *Science of The Total Environment*, vol. 624, p. 1072-1081, mai 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.187.

7 Liste des annexes

Annexes	Libellé
1	Exemple de protocole de préparation d'un extrait organique à partir d'un échantillon d'eau en vue de son analyse par bioessai <i>in vitro</i>
2	Exemple d'un protocole d'analyse d'activité œstrogénique d'un extrait organique par le bioessai <i>in vitro</i> MELN
3	Traitement des données : exemple de modélisation des courbes concentration-réponse et calcul d'équivalents-œstradiol (E2-EQ)
4	Interprétation des E2-EQ au regard de valeurs seuils

ANNEXE 1. Exemple de protocole de préparation d'un extrait organique à partir d'un échantillon d'eau en vue de son analyse par bioessai in vitro

Préalable : Le protocole décrit ici est un exemple de méthodologie qui répond au besoin de la bioanalyse de l'activité œstrogénique dans un échantillon d'eau. D'autres méthodes peuvent être trouvées dans la littérature scientifique et correspondre également au besoin de l'approche.

Cette méthode s'applique à tout échantillon d'eau de surface (eau douce ou eau littorale) et eau usée.

Dans tous les cas, il est recommandé de générer un **blanc de laboratoire** en parallèle (cf §4.3.2.), qui correspond à un échantillon d'eau ultra-pure (qualité LC-MS ou Evian) qui **subit exactement les mêmes étapes de préparation (filtration, extraction, évaporation) que l'échantillon.**

➤ Filtration

Idéalement, si elle doit être réalisée, la filtration doit se faire immédiatement après l'arrivée des échantillons au laboratoire. Il est impératif de ne pas congeler les échantillons avant cette étape, afin d'éviter une déstructuration de la matière organique lors de la décongélation et une altération de la composition chimique de l'échantillon.

Avant toute manipulation, nettoyer soigneusement les surfaces de travail avec de l'éthanol, puis les recouvrir de papier aluminium propre non pyrolysé. Les filtres utilisés (par exemple Whatman Grade GF/F ; 0,7 µm ; 55 mm ou 90 mm de diamètre, ou tout autre format adapté au système de filtration) doivent être pyrolysés à plus de 400 °C pendant au moins 5 heures afin d'éliminer toute contamination organique.

Avant la filtration, peser les bouteilles vides (en verre ambré, préalablement calcinées) destinées à la collecte du filtrat. Les masses exactes d'eau introduites dans les cartouches SPE doivent être également rigoureusement enregistrées. Installer un filtre propre dans l'appareil de filtration, puis filtrer l'échantillon. Une fois la filtration terminée, peser les bouteilles pleines et noter les masses obtenues.

Les eaux filtrées doivent être conservées à +4 °C jusqu'à leur extraction, dans un délai idéalement inférieur à 24 heures après filtration. À défaut, les échantillons filtrés peuvent être congelés à -20 °C puis extraits ultérieurement.

Remarque : si le filtre se bouche pendant la filtration, le remplacer par un filtre propre et poursuivre le processus.

➤ Extraction par SPE

Préparation du plan de travail

Avant toute manipulation, toutes les surfaces de travail du laboratoire doivent être nettoyées à l'éthanol puis recouvertes de papier aluminium propre non pyrolysé. L'ensemble du système d'extraction SPE, incluant les tubulures, les vannes et le collecteur, doit être nettoyé avant et après chaque utilisation à l'aide d'au moins deux solvants organiques de polarités différentes (par exemple : acétate d'éthyle, acétonitrile, acétone), d'eau de qualité LC/MS, puis avec un solvant de haute pureté, de préférence de qualité LC/MS.

Conditionnement des cartouches SPE

L'extraction débute par le conditionnement des cartouches SPE (par exemple, OASIS HLB 6 cc Vac Cartridge) avec 5 mL d'acétate d'éthyle (AcEt), suivi de 5 mL de méthanol (MeOH), puis de 2 × 5 mL

d'eau de qualité LC/MS. Si nécessaire, un vide doux peut être appliqué pour faciliter le passage des solvants, mais il est essentiel de ne jamais laisser les cartouches s'assécher pendant toute cette étape.

Chargement des cartouches SPE

Une fois les cartouches conditionnées, chaque litre d'échantillon d'eau filtrée doit être chargé à débit constant, à raison d'un litre d'eau par cartouche. Pour cela, les tubulures des bouteilles d'échantillons doivent être raccordées aux cartouches SPE. Sous un vide doux, les vannes sont ouvertes lentement de manière à obtenir un écoulement régulier, de l'ordre d'une goutte par seconde, à surveiller tout au long du processus. Il est impératif de ne pas laisser les cartouches s'assécher avant la fin du passage de l'échantillon.

En cas de colmatage d'une cartouche SPE, une nouvelle cartouche fraîchement conditionnée peut être utilisée pour extraire le reste de l'échantillon. Si plusieurs cartouches pour un même échantillon se colmatent, il est possible de regrouper le volume restant dans une ou plusieurs bouteilles HD-PE propres, puis de répartir ce volume entre autant de cartouches nécessaires, en veillant à regrouper les éluats ensuite.

Après le chargement complet de l'échantillon d'eau, les cartouches doivent être séchées sous vide (ou sous un léger flux d'azote) pendant 1,5 heure avant l'élution. Vérifier que le séchage est complet : l'intérieur doit être coloré et poudreux. Si l'aspect reste grumeleux, un séchage supplémentaire est nécessaire.

À noter que si l'élution ne peut pas être réalisée immédiatement après leur séchage, les cartouches correspondant à un même échantillon doivent être enveloppées dans du papier aluminium pyrolysé, placées dans un sac zip en polyéthylène étiqueté, puis conservées à -20 °C pendant quelques jours au maximum avant élution.

Elution des cartouches SPE

Après séchage, l'élution est réalisée à l'aide de solvants organiques. Si les cartouches ont été congelées, elles doivent être complètement décongelées ; pour cela elles sont déballées, puis laissées à température ambiante pendant au moins 30 minutes sur du papier aluminium propre.

Placer les cartouches sur le collecteur (*SPE manifold*) et s'assurer que chaque buse du collecteur est bien en face du tube de collecte correspondant et que les vannes sont bien fermées.

Il est préférable d'utiliser des tubes en verre ambré d'un volume de 20 à 40 mL, permettant de recueillir successivement tous les solvants sans devoir changer de tube. Si seuls des tubes en verre non ambré sont disponibles, le collecteur doit être protégé de la lumière, par exemple à l'aide de papier aluminium. Les tubes en plastique ne sont pas autorisés.

Pour l'élution, ajouter 5 mL de MeOH dans chaque cartouche et laisser reposer au moins 5 minutes afin de bien imbiber la phase solide. Ouvrir ensuite les vannes pour permettre à l'éluat de s'écouler dans les tubes, sans application de vide. Ajouter à nouveau 5 mL de MeOH. Lorsque le méthanol est passé, ajouter 2 × 5 mL d'acétate d'éthyle (EtAc), et laisser également s'écouler par gravité. Une fois tous les solvants passés, appliquer un vide pour sécher complètement les cartouches. Les tubes peuvent alors être retirés du collecteur et fermés hermétiquement à l'aide de leurs bouchons.

À noter : une autre méthode d'élution peut être utilisée, avec un rendement similaire. Elle consiste à utiliser 2 × 5 mL de MeOH, 2 × 5 mL de MeOH:dichlorométhane (DCM) (50:50 v:v), puis 2 × 5 mL de DCM. Dans ce cas, le conditionnement des cartouches est réalisé avec : 5 mL de DCM, suivis de 5 mL de MeOH:DCM (50:50 v:v), puis 5 mL de MeOH, et enfin 2 × 5 mL d'eau de qualité LC/MS.

Si l'évaporation des échantillons peut être réalisée immédiatement, il est possible de poursuivre directement. Dans le cas contraire, les tubes doivent être scellés de manière hermétique : placer du papier aluminium pyrolysé entre le tube et son bouchon pour éviter toute contamination, puis visser fermement.

➤ **Évaporation et reconstitution de l'extrait final**

Tout système de concentration ou d'évaporation disponible dans votre laboratoire, qu'il soit automatisé ou manuel (par exemple, Genevac™, XcelVap™, etc.), peut être utilisé pour cette étape.

Pour commencer, il faut placer les tubes contenant les extraits EtAc-MeOH (ou DCM-MeOH) dans le système d'évaporation. Procéder à l'évaporation complète des solvants jusqu'à sec. Si un chauffage est utilisé pour accélérer l'évaporation, la température ne doit en aucun cas dépasser 35 °C.

Une fois les extraits totalement secs, ajouter environ $3 \times 500 \mu\text{L}$ de méthanol (1,5 mL au total) dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur en verre, puis resuspendre le contenu par vortex, en évitant les éclaboussures sur le bouchon. Transférer ensuite l'extrait dans un flacon en verre ambré de 2 mL préalablement pesé. Procéder à une nouvelle évaporation du méthanol jusqu'à sec. Redissoudre l'extrait sec dans un volume spécifique de DMSO, permettant d'obtenir la concentration finale souhaitée (par exemple, dans le cas d'une eau de surface, le facteur de concentration minimal recommandé est de 4000 soit pour 1 litre d'échantillon initial, reprendre l'extrait sec dans un volume final de 0,25 mL de DMSO). Peser ensuite les flacons ambrés remplis afin de déterminer la masse exacte de DMSO ajoutée, celle-ci correspond à la différence entre la masse du flacon plein et celle du flacon vide, pondérée par la masse volumique du DMSO ($1,1 \text{ g/cm}^3$).

Conserver les flacons à -20°C jusqu'à l'analyse *in vitro*.

ANNEXE 2. Exemple d'un protocole d'analyse d'activité œstrogénique d'un extrait organique par le bioessai *in vitro* MELN

Lignée cellulaire MELN

La lignée cellulaire MELN (MCF7-ERE-Luciférase-Néomycin) est dérivée de la lignée cellulaire humaine MCF-7, des cellules de cancer du sein, qui ont été transfectées de manière stable par un plasmide ERE- β Glob-Luc-SVNeo [18]. Les cellules MELN expriment de manière endogène un récepteur fonctionnel des œstrogènes alpha (ER α).

En routine, ces cellules sont cultivées à 37 °C en présence 5 % de CO₂, dans du milieu de culture DMEM avec rouge de phénol, supplémenté de 5 % de sérum décomplémenté. Ce milieu qui contient les hormones naturellement présentes dans le sérum permet une bonne croissance des cellules dont la prolifération est dépendante des œstrogènes. Lors des tests cellulaires, celles-ci sont maintenues en milieu DMEM sans rouge de phénol, qui possède une activité œstrogénique intrinsèque, et en présence de 2 % de sérum décomplémenté et déstéroïdé (DCC).

Exposition en microplaques de 96 puits

Pour l'exposition aux produits chimiques de référence ou aux extraits organiques, les cellules MELN sont distribuées dans des microplaques de culture de 96 puits opaques blanches, à raison d'environ 10⁵ cellules par puits.

Après 24 heures d'incubation, les cellules sont exposées à une gamme de dilutions d'un d'échantillon. Celle-ci est préparée à partir de l'extrait organique initial dilué de façon sériée dans du DMSO avec un pas de 0,3. Chaque dilution est ensuite diluée au 1/200^{ème} dans le milieu de culture et déposée dans les puits contenant les cellules, de sorte à obtenir une concentration finale en DMSO constante, i.e. 0.5% v/v. A cette concentration, le DMSO n'affecte pas la viabilité cellulaire ni la réponse du test.

Pour un extrait donné, une gamme de 6 à 8 dilutions allant de 0,5% à < 0,001% v/v est généralement testée. Ensuite, selon la réponse observée et notamment si l'échantillon est très actif ou si des effets inhibiteurs (cytotoxicité) sont observés, il est recommandé d'affiner la gamme de concentrations à tester de sorte à obtenir une courbe concentration-réponse incluant au moins deux concentrations effectrices et au moins deux concentrations sans effet.

L'exposition est réalisée en triplicatas techniques au sein de la même plaque, qui inclut également un contrôle négatif (milieu de culture contenant 0,5 % de DMSO) et un contrôle positif (i.e. 17 β -estradiol à 10 nM).

Lecture du bioessai

Après 16 - 24 heures d'exposition, l'activité luciférase est mesurée dans les cellulaires MELN par luminescence. Le milieu de culture est éliminé en retournant la plaque, puis remplacé par 50 μ L par puits de milieu de culture contenant 471 μ M de luciférine (sel de potassium de D-luciférine, 30 mg mL⁻¹). La luciférine diffuse dans les cellules où elle est transformée par la luciférase, en présence d'oxygène, en oxy-luciférine, avec production de photons. Le signal luminescent qui en résulte est stable après 5 minutes et est mesuré directement dans les cellules vivantes à l'aide d'un luminomètre lecteur de microplaques.

Les résultats bruts obtenus sont exprimés en unités de luminescence relative (RLU).

ANNEXE 3. Traitement des données : exemple de modélisation des courbes concentration-réponse et calcul d'équivalents-œstradiol (E2-EQ)

Principe : modéliser les données concentration-réponse pour déterminer la concentration en échantillon ou en hormone de référence (E2) induisant 10% d'effet (EC_{10}) afin de dériver la concentration en E2-EQ dans l'échantillon.

La Figure 2 présente les différentes étapes de traitement de la donnée, depuis le résultat brut en unités de luminescence relative (RLU) obtenu pour un échantillon jusqu'à la détermination de sa concentration en ng d'E2-EQ par litre. Ces données correspondent à l'analyse d'un extrait organique d'échantillon d'eau à l'aide du bioessai MELN.

Au cours d'un essai, une gamme de dilution de chaque échantillon ainsi que de l'hormone de référence (E2) est testée (Fig 2-A). Chaque microplaque inclut un contrôle négatif sans effet (exposition au milieu de culture contenant 0.5% v/v de DMSO) et un contrôle positif (exposition à une concentration d'E2 induisant un effet maximal). Les données brutes, exprimées en unité de luminescence ou RLU, dans le cas de bioessai avec luciférase (Fig 2-A), sont alors normalisées (Fig 2-B) entre 0 % (sans effet) et 100 % (effet maximal induit par l'E2) selon l'équation (3.1) :

$$\% \text{ d'effet} = \frac{RLU_{\text{échantillon}} - RLU_{\text{contrôle DMSO}}}{RLU_{E2} - RLU_{\text{contrôle DMSO}}} \quad (3.1)$$

Par convention, un échantillon est considéré comme actif si deux concentrations consécutives ou la plus forte induisent une activité supérieure à 10 %.

Lorsqu'un échantillon est identifié comme actif, la courbe concentration-réponse est alors modélisée selon un modèle de régression non linéaire à 4 ou 5 paramètres (classiquement le modèle de Hill est utilisé [17]) (Fig 2-C) et la concentration induisant 10 % d'effet (EC_{10}) est alors déterminée. Plusieurs logiciels courants gratuits (e.g. macro Excel RegTox, R) ou payants (e.g. GraphPad) sont disponibles et très largement utilisés pour réaliser cette étape de modélisation.

La concentration en équivalents estradiol (E2-EQ en $ng L^{-1}$) est ensuite déterminée comme étant le rapport entre l' EC_{10} de l'estradiol (E2), exprimée en $ng L^{-1}$, et celle de l'échantillon exprimée en facteur d'enrichissement relatif (REF) (Fig 2-D).

Dans le cas d'un échantillon positif et de la réalisation d'un blanc terrain en parallèle (cf. §4.3.2.), si ce dernier est actif, il doit être quantifié pour déterminer sa valeur d'E2-EQ. Dans ce cas, l'échantillon n'est considéré actif que si cette valeur est 3 fois supérieure à celle du blanc terrain.

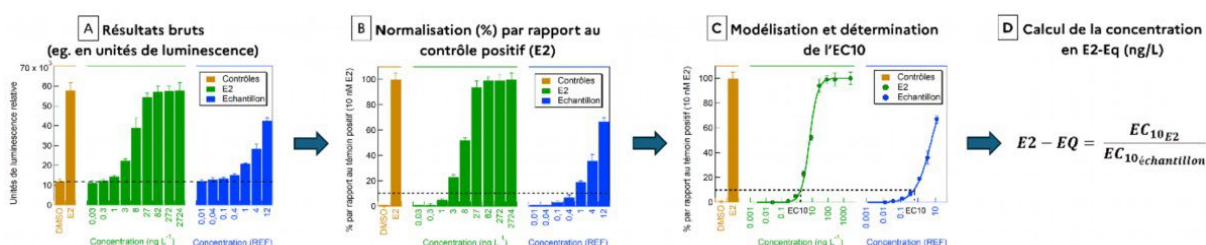


Figure 2. Bioessai MELN – Représentation des différentes étapes du traitement des données brutes (A) pour l'hormone de référence (E2, en vert) et l'échantillon (extrait organique d'eau de surface, en bleu), permettant de déterminer leurs EC_{10} (C) et de calculer la concentration en équivalents estradiol (E2-EQ) (D).

ANNEXE 4. Interprétation des E2-EQ au regard de valeurs seuils

La quantification d'une activité œstrogénique à l'aide de bioessais *in vitro* soulève la question du seuil de significativité de cette réponse vis-à-vis d'un effet potentiel à un niveau supérieur d'organisation biologique (e.g. impact à l'échelle de l'organisme) et, à plus long terme, d'un risque pour l'environnement. Dans ce but, la définition de valeurs seuils (*effect-based trigger values* ou EBT) pour les bioessais *in vitro* a fait l'objet de nombreux travaux relativement récents. Des valeurs seuils ont ainsi été proposées pour différents bioessais *in vitro*, sur la base de différents scénarios de risque basés sur les normes de qualité environnementale ou NQE [19], [20], [21], les PNECs (concentrations prédites sans effets) [22] ou à partir de données expérimentales [23], [24], [25].

Actuellement, s'il n'existe pas de valeur seuil validée au niveau réglementaire, des valeurs pour l'activité œstrogénique ont été proposées par la communauté scientifique, s'échelonnant entre 0,1 et 0,5 ng E2-EQ/L selon les bioessais (Tableau 4). Du point de vue réglementaire, le groupe de travail de la commission européenne sur les méthodes biologiques (*Working Group-Effect-Based Methods* ou WG-EBM) a proposé en 2021 une valeur seuil générique pour l'activité œstrogénique de 0,4 ng E2-EQ/L à utiliser pour la surveillance des eaux de surface dans le cadre de la Directive Cadre européenne sur l'Eau [7]. Cette valeur fait actuellement l'objet d'une réévaluation en raison de la révision récente des NQE des hormones œstrogéniques (E1, E2, EE2), la valeur seuil générique en cours d'évaluation étant de 0,1 ng E2-EQ/L (travaux en cours du WG-EBM, [26]).

Tableau 4. Sensibilité des bioessais à l'œstradiol (E2) et valeurs d'EBT proposées pour les bioessais énumérés. Tableau adapté de [21]

Bioessai	EC ₁₀ de E2 (ng/L)	EBT (ng E2-EQ/L) (Eaux de surface)
Lyticase Yeast estrogenic screen (L-YES)	8,7* [20]	1,07 [20]
<i>Arxula</i> -yeast estrogen screen (A-YES)	1,5* [20]	0,56 [20]
ERα-CALUX®	0,19 [20]	0,10 [20] 0,5 [22] 0,28 [24] 0,2 – 0,4 [27]
hERα-HeLa-9903	2,7 [20]	1,01 [20] 0,18 [24]
VM7Luc4E2	2,4 [20]	0,62 [20]
MELN (MCF-7)	0,68 [20]	0,37 [20] 0,56 [24] 0,2 – 0,3 [27]
ER-GeneBlazer (HEK293T)	1,23 [28]	0,34 [20] 0,24 [24] 0,01 – 0,20 [25]
<i>Planar</i> yeast estrogenic screen (p-YES)	-	0,50 [24]
HELN-ERα/β (Hela)	-	-
T47D-kbLUC (T47D)	-	-

*La valeur de l'EC₁₀ a été convertie à partir de l'EC₅₀ en supposant que la pente de la courbe logarithmique de la réponse à la concentration est de 1 [21].

Par analogie à la surveillance réglementaire basée sur l'analyse chimique quantitative des substances prioritaires pour lesquelles une NQE a été définie, il est proposé d'utiliser ces valeurs seuils pour déterminer un quotient de risque (RQ) dérivé des bioessais. Ce RQ_{bioessai} correspond au rapport entre la concentration en E2-EQ mesurée dans un échantillon et la valeur EBT proposée (Eq. 4.1). Si le $RQ > 1$, cela signifie que la valeur de l'EBT a été dépassée et qu'il existe donc un risque potentiel pour l'environnement.

$$RQ = \frac{E2 - EQ}{EBT} \quad (4.1)$$

www.aquaref.fr

