



**HAL**  
open science

## Dosage de l'activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) sur micro plaque

P. Noury

► **To cite this version:**

P. Noury. Dosage de l'activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) sur micro plaque. 2016, pp.14.  
hal-02602444v1

**HAL Id: hal-02602444**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02602444v1>**

Submitted on 16 May 2020 (v1), last revised 2 Feb 2024 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## MODE OPERATOIRE/PROTOCOLE

# Dosage de l'activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) sur micro plaque

### AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation d'un réactif (Folin) contenant de l'**acide** (HCl et H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation de tels produits.

Le schéma ci-contre rappelle les Equipements de Protection Individuels indispensables

Les produits et manipulations à risques ainsi que les moyens de protections spécifiques sont détaillés dans le contenu de ce document.

N° de version	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
1	Nom : NOURY Fonction : IE Date/visa : 02/02/2016	Nom : TUNTUNDJIAN Fonction : IR Date/visa : 02/02/2016	Nom : GEFFARD Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie Date/visa : 02/02/2016

### Mises à jour

N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version

## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
1.1	Objet et domaine d'application .....	2
1.2	Références .....	2
1.3	Conditions d'application .....	2
1.4	Définitions et abréviations .....	2
<b>2</b>	<b>VOLET SECURITE .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>PROTOCOLE.....</b>	<b>3</b>
3.1	Principe .....	3
3.2	Matériel et réactifs.....	3
3.2.1	Produits utilisés .....	3
3.2.2	Solutions préparées .....	4
3.2.3	Matériel .....	5
3.3	Mode opératoire .....	5
3.3.1	Echantillonnage et conservation .....	5
3.3.2	Préparation de la fraction S9.....	6
3.3.3	Gamme étalon de résorufine.....	6
3.3.4	Réglage du spectrofluorimètre.....	6
3.3.5	Préparation de la plaque et lecture.....	7
3.3.6	Calculs.....	8
3.3.7	Traitement statistique des résultats .....	9
<b>4</b>	<b>SYNTHESE DU DOCUMENT .....</b>	<b>10</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>11</b>
	<b>ANNEXE 1 : DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY .....</b>	<b>11</b>
	Principe.....	11
	Gamme étalon de Bovine Serum Albumine.....	11
	Réglage du spectrophotomètre.....	12
	Préparation de la microplaque et lecture .....	12
	Calculs.....	13
	<b>ANNEXE 2 : INJECTION DE BETA-NAPHTOFLAVONE .....</b>	<b>13</b>

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Objet et domaine d'application

Ce protocole décrit la mesure de l'activité enzymatique EROD (Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase) sur fraction post-mitochondriale (S9) d'homogénat de foie de poisson par une méthode fluorimétrique sur microplaque 96 puits. Cette mesure peut être réalisée à partir d'homogénats de foies de poissons pêchés sur le terrain ou exposés en laboratoire à des effluents ou des substances. Elle permet le diagnostic de l'exposition des poissons à des inducteurs du système CYP1A témoignant de la présence de polluants de type : PCB, HAP, dioxines...

## 1.2 Références

La méthode utilisée est adaptée de la norme AFNOR NFT 90-385 (sept. 2001).

## 1.3 Conditions d'application

Les conditions d'application et de mise en œuvre du biomarqueur EROD pour la bio-surveillance des milieux aquatiques sont exposées en détails dans le guide technique :

« *Mise au point des conditions pratiques d'utilisation du biomarqueur EROD dans un réseau de surveillance ; Noury P. Migeon B., Garric J., Flammarion P. ; 2002 ; Cemagref* »

## 1.4 Définitions et abréviations

- **Fraction S9** : surnageant obtenu après centrifugation 15 minutes à 9000g des homogénats.
- **PMSF** : PhenylMethylSulfonylFluorure.
- **DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- **EROD** : Ethoxy-Resorufine-O-Dééthylase.
- **BSA** : Bovine Serum Albumine
- **CYP1A** : Cytochrome P4501A
- **NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- **PCB** : Polychlorobiphényle
- **HAP** : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- **BNF** : Beta Naphtoflavone
- **FCR** : Force Centrifuge Relative

## 2 VOLET SECURITE





PMSF	Lowry	Folin	BNF
			

Figure 1 : Symboles de danger de la procédure

## 3 PROTOCOLE

### 3.1 Principe

On mesure la transformation par l'enzyme à cytochrome P450 de la 7 éthoxyrésorufine en résorufine (celle-ci étant 100 fois plus fluorescente). La cinétique de fluorescence est mesurée en microplaques et calibrée à l'aide d'une gamme de résorufine.

L'activité enzymatique est rapportée à la concentration totale en protéines dans le S9. Au laboratoire Ecotoxicologie d'Irstea Villeurbanne, ce dosage protéique est réalisé selon la méthode colorimétrique de Lowry et coll. (1951). La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon de BSA.

### 3.2 Matériel et réactifs

#### 3.2.1 Produits utilisés

Tableau I : Produits utilisés pour les dosages EROD et protéines

PRODUIT	N° CAS	REF.	RANGEMENT
Disodium Hydrogénophosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O)	10039-32-4	Sigma # 71650	Armoire 1 (E9)
Potassium dihydrogenophosphate, (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7778-77-0	Sigma # P5655	Armoire 1 (C7)
Potassium chlorure (KCl)	7447-40-7	Sigma # P9333	Armoire 1 (E6)
7-Ethoxyresorufine	5725-91-7	Sigma # E3763	Armoire 2 (solution) ou congél. -20 °C (poudre)
Résorufine	34994-50-8	Sigma # R3257	congél. -20 °C (poudre et sol.)
Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	67-68-5	Sigma # D5879	Armoire Solvant
Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH)	2646-71-1	Sigma # N6505	Congélateur -20°C
Bovine Serum Albumine (BSA)	9048-46-8	Sigma # A7906	Réfrigérateur 4°C
Réactif de Lowry		Sigma # L3540	Armoire 2
Réactif de Folin		Sigma # F9252	Armoire 2
PhénylMéthylSulfonylFluorure (PMSF)	329-98-6	Sigma # P7626	Armoire 1
Glycérol 99,5%,	56-81-5	Sigma # G9012	Armoire 1
Beta-Naphtoflavone,	6051-87-2	Sigma # N3633	Réfrigérateur 4°C

### 3.2.2 Solutions préparées

- Tampon phosphates (100 mM, pH 7,8)**  
 solution A : 35,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $358 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) dans 1l d'eau ultra pure.  
 solution B : 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $136 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) dans 250ml d'eau ultra pure  
 La solution A est ajustée à pH 7,8 avec la solution B. Se conserve au frais ( $3-7^\circ\text{C}$ ) jusqu'à 6 mois. Verrerie spécifique
- Tampon de broyage** : Pour la réalisation des homogénats de foie et leur conservation le tampon phosphate doit être additionné de 20% de glycérol (masse/masse). On peut aussi ajouter du PMSF ( $\text{MM}=174,2$ ) , un anti protéase, à raison de 35 mg pour 1 litre de tampon phosphate (0,2mM final)). Verrerie spécifique. Comme ce produit est peu soluble dans l'eau il est conseillé de le dissoudre préalablement dans 1 ml de DMSO.
- Solution de 7 éthoxyrésorufine 1,5 mM ( $241,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )**: Préparer une solution mère de 7 éthoxyrésorufine dans du DMSO à la concentration de 1,5 mM, concentration proche de la saturation. Par exemple, mélanger précautionneusement dans un flacon brun une dose commerciale de 5 mg à 13,82 ml de DMSO. A température ambiante et à l'obscurité cette solution se conserve 12 mois. Le jour du dosage préparer la solution de travail. Préalablement déterminer de manière colorimétrique la concentration précise de la solution mère: mesurer l'absorbance à 482 nm de 100 $\mu\text{l}$  de cette solution dans 3 ml de DMSO et calculer la concentration à l'aide du coefficient d'extinction suivant  $= 2,25 \cdot 10^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Calculer ensuite la dilution ad hoc pour la solution une solution de travail à 46  $\mu\text{M}$  (le calcul montre que le taux de dilution à appliquer à la solution mère est égal à Absorbance x 29). La solution de travail se conserve à l'obscurité à température ambiante pendant au moins une semaine.
- Solution de NADPH (5,76 mM)**: Le matin du dosage, préparer un volume juste nécessaire (environ 1 ml /plaque) de solution de NADPH ( $833,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) à 4,8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans de l'eau ultra pure. La solution est à utiliser le jour même de préférence mais peut se conserver 2 jours au frais ( $3-7^\circ\text{C}$ ). Verrerie spécifique.
- Résorufine, solution mère (SM)**: Dissoudre à l'obscurité et en agitant pendant 2h, 10,8 mg de résorufine ( $235,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) dans 100 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une concentration de 460  $\mu\text{M}$  (459 exactement). Aliquoter cette solution en tube de verre bouché et conserver 1 an maximum au congélateur  $-20^\circ\text{C}$  (congélateur biochimie)
- Résorufine, solution de travail (ST)**: On dilue la solution mère au 1/40 dans le DMSO pour obtenir la solution de travail.
- Solutions mère de BSA** : Préparer une solution mère (SM) de BSA à 0,3  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  dans de l'eau pure. (Attention lors de la pesée, la BSA est un produit électrostatique qui se colle aux parois des récipients en plastique)
- Réactif de Lowry** : le jour même préparer la solution de Lowry en ajoutant 40 ml d'eau ultra pure dans un flacon de réactif (Attention dissolution un peu longue, agiter grâce à un petit barreau aimanté). Le contenu d'un flacon suffit pour 2 microplaques de protéines
- Réactif de Folin** : Extemporément, préparer le réactif de Folin. (diluer au 1/4 du Folin 2N dans de l'eau pure). Exemple pour une plaque : 2ml de Folin 2N + 6ml d'eau pure

### 3.2.3 Matériel

- Microtubes Eppendorf 1,5ml
- Bonbonne d'Azote liquide
- Congélateur -80°C
- Spectrofluorimètre à microplaques: appareil permettant de lire des microplaques de 96 puits, avec une longueur d'onde d'excitation de 532nm et une longueur d'onde d'émission de 587nm
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Verrerie et pipettes automatiques
  - Verrerie courante de laboratoire
  - Pipettes automatiques monocanal (10µl, 200µl 1000 µl et 5000 µl) et multicanaux (8 canaux - volumes 50-300µl)
  - Embouts pour pipettes
  - Réservoirs multipipette
  - Microplaques 96 puits sans couvercle à fond plat : soit transparente (Greiner) ou noire (Costar) pour une meilleure sensibilité

## 3.3 Mode opératoire

### 3.3.1 Echantillonnage et conservation

Au terme du bio-essai ou de la pêche électrique, les poissons sont euthanasiés, puis des échantillons individuels de foie sont rapidement prélevés en évitant le percement de la vésicule biliaire. Pour chaque poisson l'échantillon de foie est lavés dans une solution de KCL puis homogénéisés dans du tampon phosphate + glycérol. A noter que la concentration en foie dans l'homogénat doit être ajustée pour obtenir une concentration en protéines totale du dans le S9 comprise entre **5 et 10 g.l<sup>-1</sup>**. Cela correspond environs à 0,2 g de foie par ml de tampon.

Pour une homogénéisation au broyeur de Potter Elvehgem, le broyage est de préférence réalisé juste après la dissection, introduit dans des tubes cryogéniques (préalablement numérotés) et congelés dans de l'azote liquide.

Pour une homogénéisation au broyeur à bille il est apparait nécessaire de congeler préalablement à sec les échantillons dans des microtubes à vis puis, le jour du dosage d'ajouter le tampon et d'effectuer le broyage.

Jusqu'à la réalisation des dosages enzymatiques et protéiques les échantillons sont stockés à -80°C (ou dans l'azote liquide). Un stockage à -20°C n'est pas suffisant pour maintenir l'intégrité enzymatique mais pourrait être utilisé en cas d'urgence pour des durées inférieures à 24 heures.

### 3.3.2 Préparation de la fraction S9

- Allumer et régler la centrifugeuse (4°C, FCR= 9000, 15 min)
- Décongeler en bain glacé (2-5°C) les échantillons nécessaires à la réalisation d'une microplaque. Centrifuger les homogénats à 9000g, à 4 °C pendant 15 minutes. La centrifugeuse permet de centrifuger 24 microtubes.
- Récupérer les surnageants (fraction S9) et les conserver à 4°C (2-5°C) en microtubes jusqu'au dosage EROD à effectuer dans l'heure. Le dosage des protéines est préférentiellement réalisé après le dosage enzymatique sauf s'il s'avère nécessaire de connaître les concentrations en protéines des S9 pour l'ajuster ensuite entre 5 et 10 g.L<sup>-1</sup> pour le dosage EROD.

### 3.3.3 Gamme étalon de résorufine

A partir de la solution de travail réaliser comme dans l'exemple ci-dessous une gamme dans le DMSO par dilution successive (exemple : raison 2/3). Chaque solution Filles (SF) de cette gamme est ensuite diluée au 1/23 dans le tampon (+BSA), soit directement dans les puits de microplaque soit en tube de verre.

**Tableau II : Gamme étalon de résorufine**

	Gamme DMSO			Gamme Tampon (=Gamme DMSO/23)			
	Conc. $\mu\text{M}$	DMSO (ml)	Resorufine (ml)	Conc. $\mu\text{M}$	Tampon (ml)	BSA 0,3 g/L	Gamme DMSO (ml)
<b>ST</b>	11,50	0	2	0,500	2,2	0,1	0,1
<b>SF1</b>	5,75	1	1ml de ST	0,250	2,2	0,1	0,1
<b>SF2</b>	2,88	1	1ml de SF1	0,125	2,2	0,1	0,1
<b>SF3</b>	1,44	1	1ml de SF2	0,063	2,2	0,1	0,1
<b>SF4</b>	0,72	1	1ml de SF3	0,031	2,2	0,1	0,1
<b>SF5</b>	0,36	1	1ml de SF4	0,016	2,2	0,1	0,1
<b>SF6</b>	0,18	1	1ml de SF5	0,008	2,2	0,1	0,1
<b>SF7</b>	0,09	1	1ml de SF6	0,004	2,2	0,1	0,1

### 3.3.4 Réglage du spectrofluorimètre

La procédure ci-dessous se réfère au matériel Tecan Safire du laboratoire d'Ecoxicologie d'Irstea Villeurbanne :

- Allumer le spectrofluorimètre (bouton derrière en bas à gauche) et l'ordinateur.
- Ouvrir le programme Xfluor4 : Demarrer/Programme/Tecan/Xfluor4 (menu Windows)
- Activer la connection avec le Safire : Xfluor/Connect/Safire (menu Excel)
- Ouvrir le menu d'onglets dans Xfluor/Edit measurement (menu Excel)
- Régler les paramètres de la mesure comme dans l'exemple ci-après (plaque Costar noire)



**Tableau III** : Paramètre de réglage du fluorimètre

Measurement mode:	Fluorescence Top	
Excitation wavelength:	532	nm
Emission wavelength:	587	nm
Excitation bandwidth:	5.0	nm
Emission bandwidth:	5.0	nm
Gain (Manual):	110	
Number of flashes:	3	
Lag time:	0	µs
Integration time:	40	µs
Plate definition file:	GRE96ft.pdf	
Z-Position (Manual):	7320	µm
Number of kinetic cycles:	13	
Kinetic interval (Minimal):	60	s

Certain paramètres peuvent être optimisés le jour du dosage, notamment le « Z-Position » (positionnement vertical de la tête de lecture) et le gain (amplification du signal). Les 6 premières minutes de la cinétique suffisent généralement à la détermination de l'activité enzymatique, la mesure peut être limitée à 3 cycles de 2 min (ou 6 de 1 min).

**Z position** : déposer dans 3 puits de microplaque 230 µl des solutions étalons de résorufine (concentration basse, intermédiaire et haute de la gamme) puis après avoir ouvert Xfluor/optimize-Z-position sélectionner dans la fenêtre les puits contenant la résorufine puis cliquer sur OK. Après la mesure régler la barre rouge du graphique au sommet des pics. Le Z position (point focal de la mesure) sera automatiquement réglé.

**Gain** : la fourchette habituellement utilisée est 100-130. Au-delà la cellule de mesure sature à la plus forte concentration de la gamme de résorufine. Pour le réglage, utiliser les puits préalablement préparés pour le réglage du Z-position (Xfluor/StartMeasurement).

### 3.3.5 Préparation de la plaque et lecture

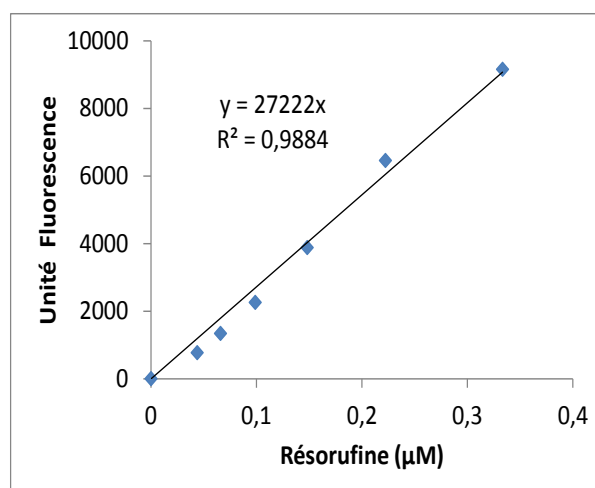
Répartir 230 µl de gamme étalon en triplicat dans les puits de la microplaque les 7 concentrations de 0,04 à 0,5 µM. Ensuite pour chaque échantillon et en triplicat ajouter :

- 200 µl de tampon phosphate (pipette multicanaux)
- 10 µl de surnageant S9 (pipette monocanal)
- 10 µl de solution d'éthoxyrésorufine (multipette) (conc. finale 2µM)
- 10 µl de solution de NADPH (multipette) (conc. finale = 250 µM)

L'ajout de NADPH implique le début de la cinétique enzymatique : lire immédiatement (Xfluor/start measurement).

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc			0,044			0,066			0,099		
B	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
C	ech13	ech14	ech15	ech16	ech17	ech18	ech19	ech20	ech21	ech22	ech23	ech24
D	0,148			0,222			0,333			0,500		

**Figure 2** : Exemple de schéma de plaque EROD



**Figure 3** : Exemple de courbe étalon de résorufine

### 3.3.6 Calculs

Les opérations du calcul de l'activité EROD se décomposent comme suit :

1. A chaque temps de la cinétique, pour chaque triplicat d'échantillon ou point de la gamme, calculer la moyenne arithmétique, l'écart type et le pourcentage de variation ( $\text{Ecartype}/\text{Moyenne} * 100$ ). Si la variabilité dépasse 20 % repérer et écarter le replicat excentrique et recalculer pour l'ensemble de la cinétique, moyenne, écart type et pourcentage de variation. Si la forte variabilité entre replicats persiste ou si elle est homogène (pas de valeur excentrique à éliminer) réaliser si possible un nouveau le dosage de l'échantillon. Résultat en UF (Unité de Fluorescence)

2. Pour chaque échantillon, à partir des moyennes de chaque temps, calculer la pente de la cinétique de fluorescence. Choisir la portion linéaire de la courbe qui se situe généralement entre 0 et 4-6 min.
3. Etablir le facteur de conversion entre UF et concentration en résorufine au moyen de la gamme étalon ( $UF = A \times [reso]$ ), puis l'appliquer à chaque cinétique de fluorescence (résultat en pmol/ml/min)
4. Multiplier le résultat de 3. par 0,23 ml pour obtenir la quantité de résorufine produite par puit de microplaque et par min. Résultat en pmol/puit/min
5. Diviser le résultat de 4. par la quantité de protéines<sup>1</sup> (en mg) contenu dans le puit pour obtenir l'activité EROD tel qu'elle est communément exprimée : en pmol/min/mg de protéines.

$$EROD = (P/A) * V / Q. \text{ (mg) } \textit{exprimé en pmol/min/mg prot}$$

P = pente de la cinétique de fluorescence de l'échantillon

A = pente de la courbe étalon de résorufine

V = volume réactionnel en ml = 0,23 ml

Q = quantité de protéine dans le puit =  $[prot.S9 \text{ mg.ml}^{-1}] \times 0,01 \text{ ml}$

### 3.3.7 Traitement statistique des résultats

Nous posons au départ l'hypothèse que toutes les réponses EROD des poissons d'un même lot (même station de pêche, même espèce, même sexe...) peuvent être considérées comme indépendantes.

La variable EROD ayant une distribution log-normale, nous réalisons une transformation de variable (transformation logarithmique) ce qui permet de présenter les résultats en log ( $\pm$  écart-type). A l'aide d'un logiciel de statistique tel que R ou STATISTICA, tester en premier lieu la normalité de distribution d'un même lot et l'homogénéité des variances (par un test de Levene). Dans un deuxième temps réaliser l'ANOVA et les calculs des probabilités du test t de Student.

Pour présenter les résultats en pmol/min/mgprot. et non en logarithme, sachant que la moyenne arithmétique  $\pm$  écart-type n'est pas un bon descripteur de la distribution EROD on préférera présenter les résultats sous forme de moyenne géométrique avec intervalle de confiance ou bien sous forme de médiane avec minimum et maximum.

---

<sup>1</sup> la quantité introduite dans chaque puit lors du dosage EROD est déterminée à partir d'un dosage séparé la concentration en protéine du S9 selon la méthode de Lowry (voir Annexe 1).

## 4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT

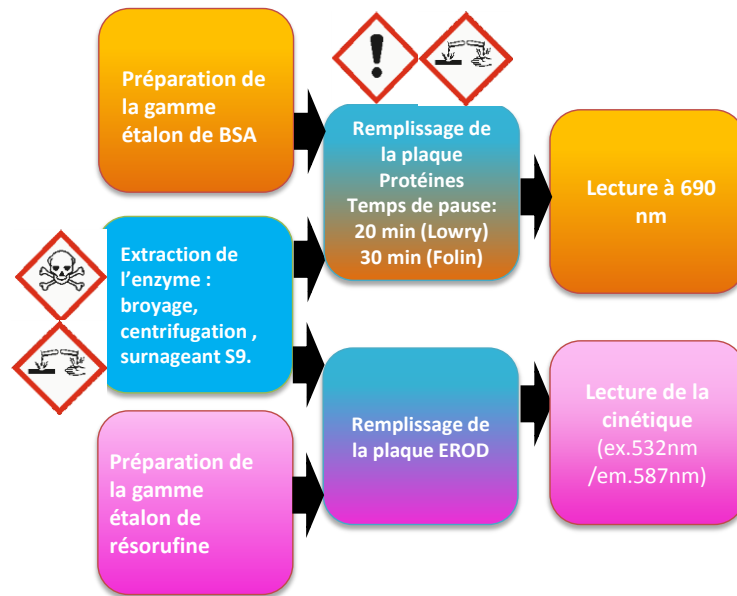


Figure 3 : diagramme de la procédure

## ANNEXES

### ANNEXE 1 : DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY

#### Principe

La méthode de Lowry est une méthode de dosage colorimétrique des protéines créée en 1951 par le biochimiste américain Oliver H. Lowry

Les protéines réagissent tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Gornall de la méthode du biuret) puis un second réactif, dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu), est ajouté. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance entre 650 et 750 nm (source : Wikipedia)

#### Gamme étalon de Bovine Serum Albumine

Le dosage des protéines doit être fait après le dosage enzymatique (plus sensible à la détérioration du matériel biologique). Il est réalisé par la méthode de Lowry qui implique une lecture colorimétrique à 690nm.

La gamme étalon peut être réalisée comme suit dans de l'eau pure à partir de la solution mère de Bovine Serum Albumine (BSA) à 0,3 g.L<sup>-1</sup>.

N°	mg/l/l	BSA (ml)	eau (ml)
1	300	6 de SM	0
2	200	4 de 1	2
3	133	4 de 2	2
4	89	4 de 3	2
5	59	4 de 4	2
6	40	4 de 5	2
<b>Blanc</b>	0	0	6

Remarque : Dans le schéma de plaque proposé en on choisira 5 concentrations de 40 à 200 mg/l ou 59 à 300 mg/l selon le mode de relation choisi. Jusqu'à 0,2 mg/l, le mode linéaire est applicable dans de bonne condition (R2=0.99) alors que jusqu'à 0.3 mg/l (voire 0,4 mg/l ) on aura intérêt à utiliser le modèle polynomiale. Des résultat obtenus se sont très bien corrélés selon la relation  $y = 0.99x$  (R2 0.9965)

## Réglage du spectrophotomètre

Entrer dans le menu d'onglet « edit measurement » puis régler l'appareil comme suit :

Measurement mode:	Absorbance
Measurement wavelength:	690nm
Number of flashes:	1
Plate definition file:	GRE96ft.pdf

## Préparation de la microplaque et lecture

Si nécessaire diluer préalablement les S9 en eau pure: une dilution au 1/5, 1/10 ou 1/20 est courante (à effectuer en microtube ou microplaque en Polypropylène)

Le mode opératoire est ensuite le suivant :

- Déposer 100 µ de chaque concentration de la gamme en quadruplicat
- Introduire 90 µl d'eau pure en triplicat pour chaque échantillon
- Ajouter 10 µl de chaque S9 (ou dilution correspondante)
- Ajouter 150 µl de réactif de Lowry (pipette multicanaux),
- Agiter 1 min. attendre 20 min (agitateur de microplaque)
- Ajouter 50 µl de réactif de Folin (1/4)
- Mélanger chaque puit à la spatule fine, Attendre 30 min
- Lire au spectrophotomètre à 690 nm

### Exemple de schéma de plaque (24 échantillons + 5 concentrations en BSA)

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc		59		89		133		200		300	
B	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
C	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
D	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
E	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
F	ech1	ech2	ech3	ech4	ech5	ech6	ech7	ech8	ech9	ech10	ech11	ech12
G	ech13	ech14	ech15	ech16	ech17	ech18	ech19	ech20	ech21	ech22	ech23	ech24
H	ech13	ech14	ech15	ech16	ech17	ech18	ech19	ech20	ech21	ech22	ech23	ech24

## Calculs

- Calcul des moyennes arithmétique, écart type et pourcentage de variation pour chaque triplicat (ou quadriplicat) des échantillons ou de la gamme.
- Si variabilité > 15 % correction des moyenne par élimination de la valeur excentrique.
- Soustraction du blanc aux absorbances des échantillons et de la gamme de BSA
- Courbe étalon établie au moyen d'un modèle linéaire ou polynomiale.
- Conversion des absorbances des échantillons en concentration de protéines dans le S9 (tenir compte des dilutions). La quantité Q en de mg de protéines par puit est utilisée pour l'expression du dosage EROD :  $Q = [\text{prot.S9 mg/ml}] \times 0.01$

## ANNEXE 2 : INJECTION DE BETA-NAPHTOFLAVONE

Sur l'espèce de poisson testée il est possible d'évaluer l'inductibilité du système P450 par une injection intrapéritonéale (i.p) de béta-naphtoflavone dans de l'huile d'arachide (l'huile seule n'entraîne pas d'induction supplémentaire).

Avant l'injection, la béta-naphtoflavone en solution dans de l'huile d'arachide est correctement agitée puis portée à 45°C (40-50°C) au bain marie afin d'améliorer l'homogénéité.

Chaque poisson est pesé et reçoit une injection en fonction de son poids (100 µl injecté pour 10 g de poids vif pour les truitelles ou goujons mais 100µl pour 100g pour de plus gros poissons).

Une injection de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> est suffisante mais 50mg.kg<sup>-1</sup> permet en général d'atteindre le maximum d'induction.

---

**Fin du document**