



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-02602444v2

HAL Id: hal-02602444

<https://hal.inrae.fr/hal-02602444v2>

Submitted on 2 Feb 2024

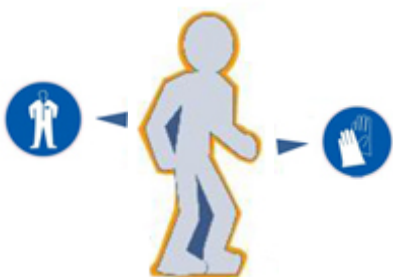
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 microplaque

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le schéma ci-contre rappelle les Equipements de Protection Individuels (EPI) 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	Nom : TUNTUNDJIAN Fonction : IR	Nom : CHAUMOT Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie

Mises à jour

N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version
1.1	30/01/2024	PN	Mise au format Inrae, corrections mineures, changement figure 3

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	2
1.1	Objet et domaine d'application	2
1.2	Références	2
1.3	Conditions d'application	2
1.4	Définitions et abréviations	2
2	VOLET SECURITE	3
3	PROTOCOLE	3
3.1	Principe	3
3.2	Matériel et réactifs	3
3.2.1	Matériel	3
3.2.2	Produits utilisés	4
3.2.3	Solutions préparées	4
3.3	Mode opératoire	5
3.3.1	Echantillonnage et conservation	5
3.3.2	Préparation de la fraction S9	5
3.3.3	Gamme étalon de résorufine	6
3.3.4	Réglage du spectrofluorimètre	6
3.3.1	Préparation de la microplaque	7
3.3.1	Calculs	8
3.3.1	Traitement statistique des résultats	9
4	SYNTHESE DU DOCUMENT	9
	ANNEXE	10

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

Pour les besoins du présent mode opératoire, les définitions et abréviations suivantes sont nécessaires :

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

2 VOLET SECURITE



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'INRAE Villeurbanne, ce dosage protéique est réalisé selon la méthode colorimétrique de Bradford¹. 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 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 : transparente (Greiner) ou noire (Costar) pour une meilleure sensibilité

¹ Bradford, M. M. (1976); A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

3.2.2 Produits utilisés

Tableau I : Produits utilisés

PRODUIT	N° CAS	REF.	RANGEMENT
Disodium Hydrogénophosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	10039-32-4	Sigma # 71650	Armoire 1 (E9)
Potassium dihydrogenophosphate, (KH_2PO_4)	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
PhénylMéthylSulfonylFluorure (PMSF)	329-98-6	Sigma # P7626	Armoire 1
Glycérol 99,5%,	56-81-5	Sigma # G9012	Armoire 1

3.2.3 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 KH_2PO_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.
- Tampon + BSA 0,3 g/l** : dissoudre par exemple 15 mg de BSA dans 50 ml de tampon
- 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 μl 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 μM (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 ($235,2 \text{ g.mol}^{-1}$) 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°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.
Cette solution à 500 U/ml est ensuite aliquotée en tube de 0,5 ml à raison de $40 \mu\text{l}$ (20 U) par tube puis congelés et conservés à -80°C .

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 lavé dans une solution de KCL puis homogénéisé dans du tampon phosphate + glycérol. A noter que la concentration en foie dans l'homogénat doit être ajustée pour obtenir une concentration en protéines totales dans le S9 comprise entre 5 et 10 g.l^{-1} . 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 ($2-5^{\circ}\text{C}$) 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 ($2-5^{\circ}\text{C}$) 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^{-1} 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 ou 1/2). 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. μM	DMSO (ml)	Resorufine (ml)	Conc. μM	Tampon (ml)	BSA 0,3g/L	Gamme DMSO (ml)
11,50	0	2	0,500	2,1	0,1	0,1
7,67	1	1ml de ST	0,333	2,1	0,1	0,1
5,11	1	1ml de SF1	0,222	2,1	0,1	0,1
3,41	1	1ml de SF2	0,148	2,1	0,1	0,1
2,27	1	1ml de SF3	0,099	2,1	0,1	0,1
1,51	1	1ml de SF4	0,066	2,1	0,1	0,1
1,01	1	1ml de SF5	0,044	2,1	0,1	0,1
0,00	1	1ml de SF6	0,000	2,1	0,1	0,1

3.3.4 Réglage du spectrofluorimètre

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

- Allumer le spectrofluorimètre (bouton derrière en bas à gauche) et l'ordinateur.
- Ouvrir le programme Xfluor4 : Démarrer/Programme/Tecan/Xfluor4 (menu Windows)
- Activer la connexion 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 Xfluo/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 (Xfluo/StartMeasurement).

3.3.1 Préparation de la microplaque

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 (multipipette) (conc. finale 2µM)
- 10 µl de solution de NADPH (multipipette) (conc. finale = 250 µM)

L'ajout de NADPH implique le début de la cinétique enzymatique : lire immédiatement (Xfluo/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		
E	0,148			0,222			0,333			0,500		
F	0,148			0,222			0,333			0,500		
G	0,148			0,222			0,333			0,500		
H	0,148			0,222			0,333			0,500		

Figure 2 : Exemple de schéma de plaque EROD

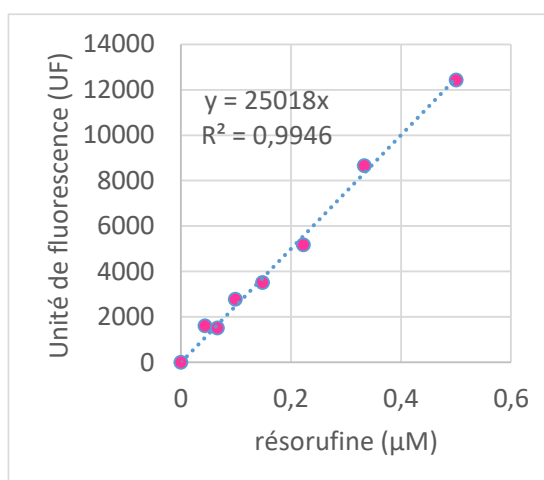


Figure 3 : Exemple de courbe étalon de résorufine

3.3.1 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 (Ecartype/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 protéines² (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 = $[prot.S9 \text{ mg.ml}^{-1}] \times 0,01\text{ml}$

² la quantité introduite dans chaque puit lors du dosage EROD est déterminée à partir d'un dosage séparé la concentration en protéines.

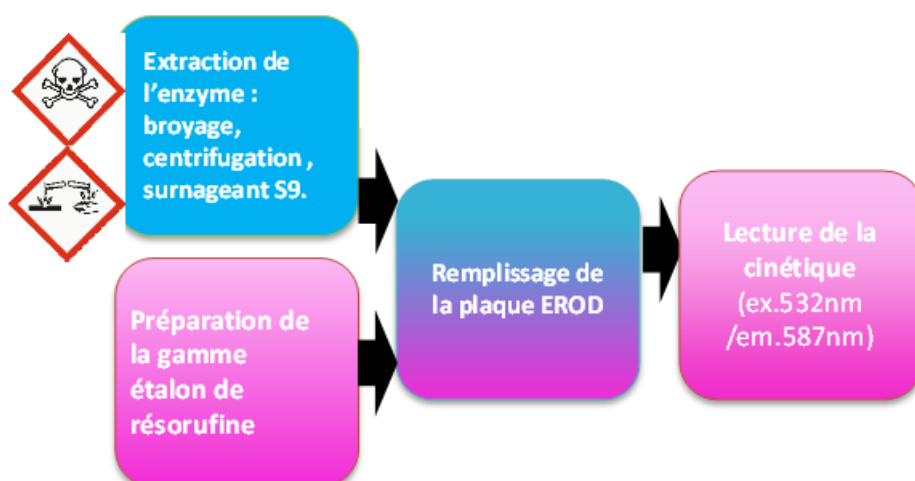
3.3.1 Traitement statistique des résultats

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). A l'aide d'un logiciel de statistique tel que R ou STATISTICA, tester en premier lieu la normalité de distribution (test de Shapiro) d'un même lot et l'homogénéité des variances (test de Levene). Dans un deuxième temps, réaliser une ANOVA pour comparer les moyennes des différentes conditions expérimentales.

Les moyennes et les écart type des valeurs log sont ensuite converties en pmol/min/mgprot. pour une présentation concrète des données (moyennes géométriques). La médiane est également un bon descripteur d'un groupe expérimental.

4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT



ANNEXE

INJECTION DE BETA-NAPHTOFLAVONE (BNF)

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⁻¹ est suffisante mais 50mg.kg⁻¹ permet en général d'atteindre le maximum d'induction.