



HAL
open science

Utilisation d'un nouveau substrat coumarinique pour l'étude des activités monooxygénases à cytochrome P-450 à partir d'une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Alain Devaux, Gilles Monod, J.F. Masfaraud, C. Vaillant

► To cite this version:

Alain Devaux, Gilles Monod, J.F. Masfaraud, C. Vaillant. Utilisation d'un nouveau substrat coumarinique pour l'étude des activités monooxygénases à cytochrome P-450 à partir d'une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1991, 312, pp.63-69. hal-02712896

HAL Id: hal-02712896

<https://hal.inrae.fr/hal-02712896>

Submitted on 1 Jun 2020

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.

Utilisation d'un nouveau substrat coumarinique pour l'étude des activités monooxygénases à cytochrome P-450 à partir d'une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Alain DEVAUX, Gilles MONOD, Jean-François MASFARAUD et Colette VAILLANT

Résumé – L'activité monooxygénase 7-éthoxy-4-trifluorométhylcoumarine O-dééthylase (7EFCOD) est caractérisée dans une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel et comparée à l'activité 7-éthoxycoumarine O-dééthylase (7ECOD). Son inductibilité par un inducteur modèle, la β -naphthoflavone, son niveau d'activité élevé et la bonne sensibilité de son dosage en fluorimétrie en font une activité enzymatique adaptée aux situations où le matériel biologique est limité en quantité, comme les cultures primaires d'hépatocytes.

Use of a new coumarin analog in the study of cytochrome P-450 dependent monooxygenase activities in primary culture of rainbow trout hepatocytes (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract – The 7-ethoxy-trifluoromethylcoumarin O-deethylase monooxygenase activity (7EFCOD) was characterized in a primary culture of rainbow trout hepatocytes and compared to the 7-ethoxycoumarin O-deethylase one (7ECOD). Its inducibility by the model inducer β -naphthoflavone, its high basal activity and high fluorimetric sensitivity make this assay particularly useful in situations where test material is quantitatively limited, e. g. when measuring activity in primary culture of hepatocytes.

Abridged English Version – In the field of ecotoxicology, a lot of *in vitro* studies are focused on measurement of cytochrome P450-dependent hepatic monooxygenase activities (MO) in fish. MO system is one of the major enzymatic systems involved in the metabolism of foreign compounds. In addition to being substrates for MO, many xenobiotics like polychlorobiphenyls and polyaromatic hydrocarbons are known to be inducers of these activities ([4], [6]). In fish, this induction phenomenon can be considered as an early warning system for fish exposure to water contaminants [7] and for subsequent toxicological risks [8]. Primary culture of hepatocytes is a valuable tool for studying biotransformation activities since such a system is quite closed in its biochemical and physiological responses to liver cells in the intact animal [9]. Previous work has shown that MO activities and their induction by known inducers can be measured in primary culture of trout hepatocytes ([10], [11]). But the lack of sensitivity may be a serious handicap in systems, such as cultured hepatocytes, where material is scarce (300-600 μ g total proteins/ 10^6 cells). That leads to search for new substrates corresponding to more sensitive assays. This work dealt with the characterization of a MO activity in primary culture of trout hepatocytes which was recently studied in rat [12], using a new coumarin analog as a substrate.

Hepatocytes were isolated from immature rainbow trout by the two-step perfusion method using collagenase [13]. Hepatocytes were seeded on Petri dishes at a density of 2×10^6 viable cells/ml medium (medium 199, SIGMA) buffered with Hepes pH 7.4 and incubated at 12°C. 7-ethoxycoumarin O-deethylase (7ECOD) and 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylase (7EFCOD) measurements were carried out in whole cell homogenate (final

Note présentée par René TRUHAUT.

0764-4469/91/03120063 \$ 2.00 © Académie des Sciences

volume 1 ml) in a phosphate buffer pH 7.4 with a NADPH generating system at 20°C. Assay was started by addition of substrate to the culture medium (substrate concentrations were 200 µM for 7ECOD and 100 µM for 7EFCOD). Reaction was stopped by addition of trichloroacetic acid (final concentration: 2% v/v). After centrifugation, reaction products were extracted from the supernatant with 4 ml ethyl-acetate and quantified fluorimetrically as previously described [6]. Figure 1 shows that 7ECOD and 7EFCOD activities were linear as a function of incubation time until 30 min. but specific activity remained higher for 7EFCOD than 7ECOD (3 to 4 fold). At very low protein concentrations, the calculated specific activity appeared to decrease more rapidly for 7ECOD than for 7EFCOD activity. Protein concentration for which specific activity began to deviate significantly from that calculated at 600 µg protein/ml was between 60 and 300 µg/ml for 7ECOD and 6 and 30 µg/ml for 7EFCOD, indicating that 7EFCOD assay was approximately 10 times more sensitive than 7ECOD one (Table). Similar results were obtained by Deluca *et al.* [12] in rat liver microsomes. Lack of fluorimetric interference between the required cofactor NADPH (excitation wavelength 340 nm, emission 460 nm) and product of the 7EFCOD assay (excitation 410 nm, emission 510 nm), gave to it some distinct advantages over 7ECOD assay (excitation 380 nm, emission 480 nm). Time course of induction by βNF and induction ratio appeared to be the same for both 7ECOD and 7EFCOD activities (Figs. 2, 3). Induction ratios remained quite low (2.5 fold) as previously shown for 7ECOD in fish hepatocyte culture [10]. High basal level of MO activities in control group may argue for inducer contaminated diet, leading to a lower induction rate. Deluca *et al.* [12] have shown differences in inducibility of 7ECOD and 7EFCOD activities in rat by 3-methylcholanthrene, a βNF-like inducer. We did not obtain such results with βNF in trout. These authors have also obtained a higher induction of 7EFCOD than 7ECOD by phenobarbitone (PB), a model inducer specific for another cytochrome P-450 group. Because of its characteristics, it should be interesting to study the effect of PB on 7EFCOD activity in primary culture of fish hepatocytes; although most studies indicate that MO in fish are not affected by phenobarbitone-type inducers [18], recent results are inconsistent with this assumption [19]. Figure 4 shows that induction by βNF modified strongly 7EFCOD kinetic parameters confirming previous reports ([12], [16], [17]). Our results show that the new coumarin analog 7EFC may be used as a valuable substrate for MO activity measurement in primary hepatocyte culture, since it leads to a highly sensitive assay (with a very low fluorimetric background) responding to βNF, a known MO inducer in fish. Further experiments have to be performed for studying effect of other types of inducers on 7EFCOD activity.

INTRODUCTION. — La présence chez les poissons de systèmes enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques est maintenant bien établie ([1], [2], [3]). Les recherches dans ce domaine sont centrées notamment sur l'étude *in vitro* des activités monooxygénases hépatiques dépendant du cytochrome P-450. Une caractéristique importante de ces enzymes est leur capacité à être induites par des polluants majeurs du milieu aquatique tels que les polychlorobiphényles et les hydrocarbures polyaromatiques ([4], [5], [6]). L'induction des monooxygénases à cytochrome P-450 chez les poissons a été proposée comme indicateur de leur exposition aux polluants [7] et comme révélateur précoce de risques toxicologiques potentiels [8]. Les hépatocytes en culture primaire représentent un système particulièrement intéressant dans l'étude du métabolisme des xénobiotiques : ils

constituent en effet un système intermédiaire entre les études *in vivo* (ou sur des foies perfusés isolés), et *in vitro* utilisant des fractions subcellulaires hépatiques ou des enzymes purifiées [9]. Des études précédentes ont démontré que les hépatocytes de truite arc-en-ciel en culture primaire permettaient l'expression et l'induction d'activités enzymatiques de biotransformation ([10], [11]). Néanmoins, la faible quantité de matériel biologique disponible dans le cas des hépatocytes (300-600 μg de protéines totales/ 10^6 cellules) peut être une limite qui justifie la recherche de nouveaux substrats permettant d'augmenter la sensibilité de la mesure de ces activités enzymatiques. L'utilisation comme substrat d'un nouvel analogue coumarinique, la 7-éthoxy-4-trifluorométhylcoumarine (7EFC) a donné récemment des résultats intéressants à partir de microsomes de rat [12]. Le but du présent travail est l'étude de l'activité 7-éthoxy-4-trifluorométhylcoumarine O-dééthylase (7EFCOD) dans des hépatocytes en culture primaire de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et sa comparaison avec une activité apparentée classiquement utilisée, la 7-éthoxycoumarine O-dééthylase (7ECOD).

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — Les hépatocytes sont isolés à partir de truite arc-en-ciel immature par une modification de la technique de perfusion à la collagénase en deux étapes [13] puis cultivés à 12°C sur boîte de Petri dans un milieu tamponné à l'Hepes pH 7,4 ajusté à 300 mosmoles (milieu 199 SIGMA). Chaque perfusion fournit 500-600 $\cdot 10^6$ cellules ayant une viabilité supérieure à 90 % mesurée par le test d'exclusion au bleu Trypan.

L'agent inducteur, la beta-naphtoflavone (βNF , Aldrich), est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et ajouté à raison de 10 μl pour 10 ml de milieu de culture (concentrations finales DMSO : 0,1 % v/v, βNF : 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) après 24 h de culture. Les témoins reçoivent du DMSO seul. Les homogénats cellulaires sont préparés à l'aide d'un Potter-Elvehjem dans un tampon KCl phosphate 50 mM pH 7,4. Les activités enzymatiques 7EFCOD et 7ECOD sont mesurées à 20°C aux temps 24, 48, 72 et 96 h après le début de l'induction dans un volume final de 1 ml contenant 50 mM de tampon KCl-phosphate pH 7,4, 1 mM NADP, 10 mM glucose-6-phosphate, 2 unités/ml de glucose-6-phosphate déshydrogénase et l'homogénat cellulaire. La réaction débute par ajout du substrat (7-éthoxycoumarine à 200 μM , 7EFC à 100 μM , Enzyme Systems Products) dans 10 μl de DMSO et est arrêtée par 100 μl d'acide trichloroacétique à 20 %. Après centrifugation et extraction par 4 ml d'acétate d'éthyle, les produits de la réaction [7-hydroxycoumarine ou 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine (7FHC)] sont mesurés en fluorimétrie (longueurs d'onde d'excitation 380 et 410 nm respectivement et longueurs d'onde d'émission 480 et 510 nm respectivement) en présence d'un mélange éthanol-tampon glycine (v/v) pH 10,4. On utilise comme étalon le produit de la réaction. Le dosage des protéines est réalisé selon Hartree [14].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 montre l'évolution des activités 7ECOD et 7EFCOD en fonction du temps d'incubation. L'activité 7ECOD est linéaire durant 30 mn et a pour valeur 10-20 pmoles/mn \times mg protéines. Ce résultat est en accord avec ceux d'autres auteurs ([10], [15]) obtenus sur des hépatocytes de truite (cellules entières) après déconjugaison par la β -glucuronidase. L'activité 7EFCOD reste linéaire durant 30 mn également mais présente un niveau plus élevé de l'ordre de 40-50 pmoles/mn \times mg protéines.

Le tableau présente l'évolution des activités 7ECOD et 7EFCOD en fonction de la teneur en protéines totales de l'homogénat. Pour des concentrations en protéines très

TABLEAU
 Comparaison de la sensibilité des activités 7ECOD et 7EFCOD.
Comparison of 7ECOD and 7EFCOD assay sensitivity.

Concentration en protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Activité spécifique ($\text{pmole/mn} \times \text{mg protéines}$)	
	7ECOD	7EFCOD
600	16,3 (*) (0,2) (e)	48,1 (*) (0,4)
300	18,7 (*) (0,6)	43,8 (*) (0,9)
60	10,4 (*) (0,9)	49,0 (*) (1,2)
30	NR (b)	48,2 (d) (1,5)
6	NR (b)	37,5 (d) (1,9)

(*) Écart-type déterminé à partir de quatre réplicats.

(b) Valeur inférieure au seuil de détection.

(c) 10 mn d'incubation.

(d) 30 mn d'incubation.

faibles, il n'est plus possible de mesurer l'activité 7ECOD contrairement à l'activité 7EFCOD. La teneur en protéines pour laquelle l'activité spécifique commence à dévier significativement de celle calculée pour 600 $\mu\text{g/ml}$ de protéines est approximativement de 60 à 300 $\mu\text{g/ml}$ pour l'activité 7ECOD et 6 à 30 $\mu\text{g/ml}$ pour l'activité 7EFCOD, indiquant que cette dernière est environ 10 fois plus sensible que la précédente. Un résultat similaire a été obtenu par Deluca et coll. [12] avec des microsomes hépatiques de rat. De plus, ces auteurs ont montré qu'aux longueurs d'onde utilisées pour la détermination de la 7EFCOD (excitation : 410 nm, émission : 510 nm), la somme des fluorescences du cofacteur NADPH (source d'électrons de la réaction) et de la 7EFC qui interfèrent, était 1 000 fois inférieure à la fluorescence du 7HFC alors que pour l'activité 7ECOD (excitation : 380 nm, émission : 480 nm) le NADPH (excitation : 340 nm, émission : 460 nm) présente une interférence très importante avec le produit 7HC. Ces caractéristiques spectrales (haut rendement de fluorescence), combinées à une forte activité basale amènent à une sensibilité élevée de l'activité 7EFCOD, ce qui la rend particulièrement intéressante dans le cas de cultures primaires d'hépatocytes de poisson.

Les cinétiques d'induction des activités 7ECOD et 7EFCOD semblent identiques avec un maximum d'induction après 72 h, le taux d'induction étant de 2,5 pour les deux substrats (fig. 2 et 3). Les taux d'induction obtenus restent faibles mais toutefois voisins de ceux obtenus par Vaillant et coll. pour l'activité 7ECOD [10]. L'hypothèse d'une induction antérieure par des contaminants présents dans l'alimentation des truites ne peut être écartée et pourrait contribuer à diminuer l'effet de l'inducteur lors de l'expérimentation. Deluca et coll. [12] ont montré chez le rat une induction plus importante de l'activité 7ECOD que de l'activité 7EFCOD par le 3-méthylcholanthrène, inducteur du même type que la β NF. L'hypothèse de l'intervention d'une forme enzymatique différente pour le substrat 7EFC, du fait du groupement 4-trifluorométhyl, a été avancée. Nous n'avons pas mis en évidence cette différence lors de l'induction des activités 7ECOD et 7EFCOD par la β NF dans les cultures d'hépatocytes de truite. D'autre part, ces mêmes auteurs ont montré une induction plus importante de l'activité 7EFCOD que de l'activité 7ECOD par un inducteur spécifique d'autres formes de cytochrome P-450, le phéno-barbital (PB). Compte tenu de la grande sensibilité de la mesure de l'activité 7EFCOD, il serait particulièrement intéressant de vérifier l'inductibilité éventuelle de cette activité

par le PB et de la comparer à celle de la 7ECOD dans les hépatocytes de truite en culture. Il est couramment admis l'impossibilité d'induire des cytochromes P-450 par des molécules de type PB chez le poisson [18], mais des résultats récents contredisent cette affirmation [19].

Deluca et coll. [12] ont noté une diminution du K_m apparent d'un facteur 4,6 pour l'activité 7EFCOD chez le rat, après induction par le 3 MC. La représentation inverse de Lineweaver et Burke permet le calcul après régression linéaire des paramètres cinétiques V_{max} et K_m pour le substrat 7EFC (*fig. 4*). Pour les hépatocytes témoins $V_{max} = 66$ pmoles/mn \times mg protéines, $K_m = 50 \mu\text{M}$ et pour les hépatocytes induits on obtient $V_{max} = 140$ pmoles/mn \times mg protéines, $K_m = 14,3 \mu\text{M}$, ce qui confirme les résultats de Deluca et coll. Ces changements ont été également mis en évidence pour l'activité 7ECOD chez la souris par Ullrich et Weber [16] et chez le rat par Greenlee et Poland [17]. De plus ces auteurs ont démontré l'existence de deux populations distinctes d'enzymes de K_m différents dans les microsomes de souris témoins et induites. Ceci n'a pas été mis en évidence dans les homogénats d'hépatocytes témoins et induits de truite, vraisemblablement du fait de la faible solubilité du 7EFC qui limite la possibilité de travailler à des concentrations supérieures à $100 \mu\text{M}$, mais qui permet ainsi de s'adresser à une population homogène d'enzyme.

CONCLUSION. — Les résultats présentés confirment que la culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel permet l'expression et l'induction d'activités enzymatiques de biotransformation. Le nouveau substrat coumarinique 7EFC présente l'avantage par rapport à la 7EC d'un niveau d'activité plus élevé, d'une sensibilité plus importante lors du dosage fluorimétrique et conserve une inductibilité équivalente par la β -naphthoflavone. Du fait de ses propriétés, il serait intéressant d'étudier chez la truite l'inductibilité de cette activité par d'autres inducteurs, comme le phénobarbital.

Note remise le 8 octobre 1990, acceptée après révision le 29 novembre 1990.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. R. BUHLER et M. E. RASMUSSEN, *Comp. Biochem. Physiol.*, 25, 1968, p. 223-239.
- [2] J. E. CHAMBERS et J. D. YARBROUGH, *Comp. Biochem. Physiol.*, 55, 1976, p. 77-84.
- [3] R. L. BINDER et J. J. STEGEMAN, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1983, p. 1324-1327.
- [4] M. J. VODICNIK, C. R. ELCOMBE et J. J. LECH, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 59, 1981, p. 364-374.
- [5] R. B. SPIES, J. S. FELTON et L. DILLARD, *Mar. Biol.*, 70, 1982, p. 117-127.
- [6] G. MONOD, A. DEVAUX et J.-L. RIVIÈRE, *Sci. Total Environ.*, 73, 1988, p. 189-201.
- [7] J. F. PAYNE, L. L. FANCEY, A. D. RAHIMTULA et E. L. PORTER, *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C, 1987, p. 2133-2145.
- [8] C. IOANNIDES et D. V. PARKE, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1987, p. 4197-4207.
- [9] D. ACOSTA, E. M. B. SORESEN, D. C. ANUFORO, D. B. MITCHELL, K. RAMOS, K. S. SANTONE et M. A. SMITH, *In Vitro*, 21, 1985, p. 495-504.
- [10] C. VAILLANT, G. MONOD, Y. VALOTAIRE et J.-L. RIVIÈRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 308, série III, 1989, p. 83-88.
- [11] M. PESONEN, A. GOKSOYR et T. ANDERSSON *Mar. Environ. Res.*, 28, 1989, p. 113-116.
- [12] J. G. DELUCA, G. R. DYSART, D. RASNICK et O. MATTHEWS, *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1988, p. 1731-1739.
- [13] P. O. SEGLEN, dans *Methods in cell biology*, D. M. PRESCOTT éd., Academic Press, New York, 13, 1976, p. 29-83.
- [14] E. F. HARTREE, *Analyt. Biochem.*, 48, 1972, p. 422-427.
- [15] T. ANDERSSON et L. FORLIN, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1985, p. 1407-1413.
- [16] V. ULLRICH et P. WEBER, *Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem.*, 353, 1972, p. 1171-1177.

-
- [17] W. F. GREENLEE et A. POLAND, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 205, 1978, p. 596-603.
[18] J. J. STEGEMAN, *Xenobiotica*, 19, 1989, p. 1093-1110.
[19] G. T. ANKLEY, R. E. REINERT, R. T. MAYER, M. D. BURKE et M. AGOSIN, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1987, p. 1379-1381.

C. V. : École de Chimie de Paris,
Laboratoire de Chimie organique industrielle, 11, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris;
A. D., G. M. et J.-F. M. : *Institut national de la Recherche agronomique*,
Laboratoire d'Écotoxicologie I.N.R.A.-E.N.V.L.,
École nationale Vétérinaire de Lyon, B. P. n° 83, 69280 Marcy-l'Étoile.

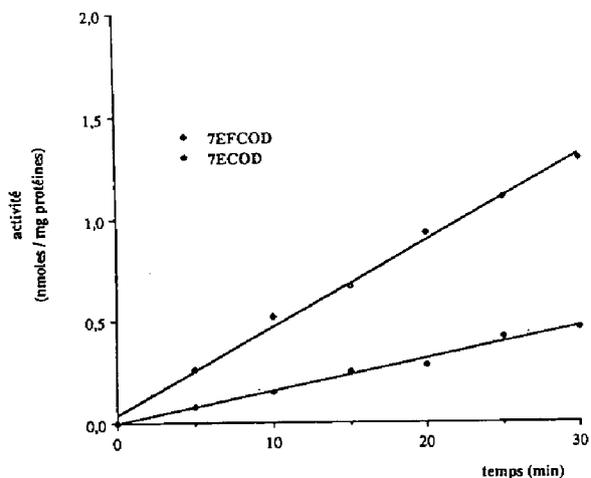


Fig. 1

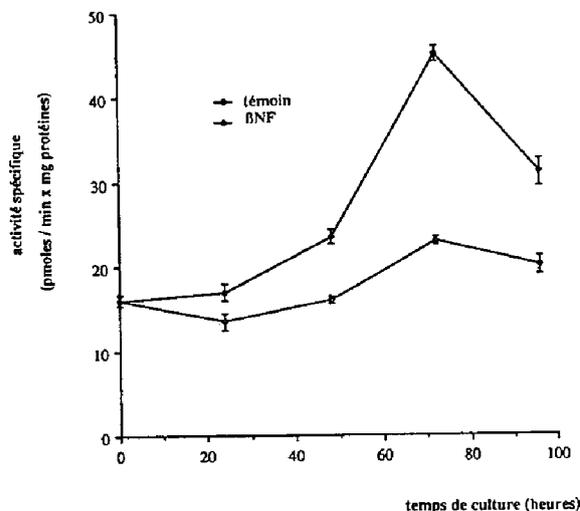


Fig. 2

Fig. 1. - Linéarité des activités 7ECOD et 7EFCOD en fonction du temps d'incubation (moyenne de trois boîtes, les écarts-type ne sont pas représentés car trop faibles).

Fig. 1. - Linearity of 7ECOD and 7EFCOD activities as a function of incubation time (mean of three dishes, standard deviations are too low to be drawn).

Fig. 2. - Cinétique d'induction de l'activité 7ECOD par la β-naphtoflavone (moyenne de quatre boîtes, les écarts-type sont symbolisés par des barres verticales).

Fig. 2. - Time course induction of 7ECOD activity by β-naphthoflavone (mean of four dishes, standard-deviations are shown as vertical bars).

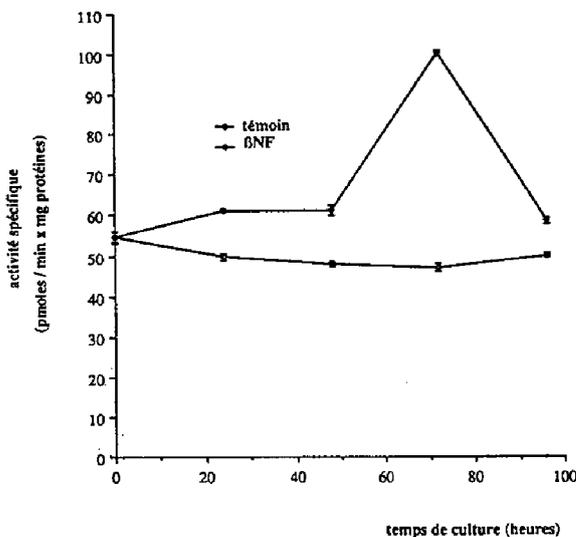


Fig. 3

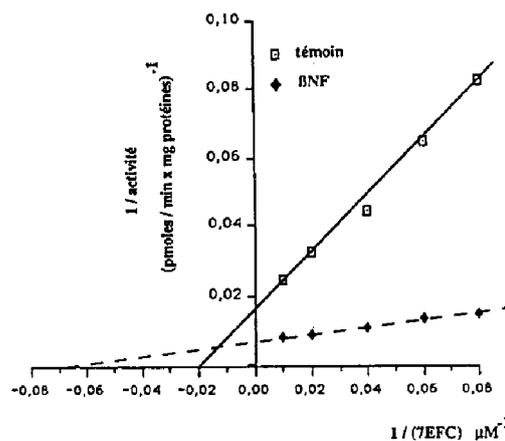


Fig. 4

Fig. 3. - Cinétique d'induction de l'activité 7EFCOD par la β-naphtoflavone (moyenne de quatre boîtes).

Fig. 3. - Time course induction of 7EFCOD activity by β-naphthoflavone (mean of four dishes).

Fig. 4. - Représentation de Lineweaver et Burk pour l'activité 7EFCOD dans le cas d'hépatocytes témoins et induits par la β-naphtoflavone (moyenne de quatre boîtes, les écarts-type ne sont pas représentés car trop faibles).

Fig. 4. - Lineweaver-Burk plots for 7EFCOD activity measured in control and βNF-induced hepatocytes (mean of four dishes, standard deviations are too low to be drawn).