



# Measurement and induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activities in a primary culture of rainbow-trout (*Salmo-gairdneri*) hepatocytes

Colette Vaillant, Gilles Monod, Yves Valotaire, Jean-Louis Riviere

## ► To cite this version:

Colette Vaillant, Gilles Monod, Yves Valotaire, Jean-Louis Riviere. Measurement and induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activities in a primary culture of rainbow-trout (*Salmo-gairdneri*) hepatocytes. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 1989, 308, pp.83-88. hal-02728879

**HAL Id: hal-02728879**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02728879>**

Submitted on 2 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.

## Mise en évidence et induction du cytochrome P-450 et d'activités monooxygénases dans une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*)

Colette VAILLANT, Gilles MONOD, Yves VALOTAIRE et Jean-Louis RIVIÈRE

**Résumé** — La teneur en cytochrome P-450 et les activités monooxygénases, 7-éthoxycoumarine O-dééthylase (ECOD) et 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) sont mesurées dans une culture primaire d'hépatocytes de truite; elles sont relativement stables durant au moins 96 h de culture. Les activités ECOD et EROD des hépatocytes sont induites après exposition à un inducteur type, la  $\beta$ -naphthoflavone. Ce système cellulaire pourrait donner lieu à des applications dans le domaine de l'écotoxicologie.

### Measurement and induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activities in a primary culture of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) hepatocytes

**Abstract** — Cytochrome P-450 and monooxygenase activities, 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD) and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), were quantified at a nearly constant level for up to 96 hrs. of culture. Furthermore, EROD and ECOD activities were induced following exposure of hepatocytes to a model inducer,  $\beta$ -naphthoflavone. This system should be a useful tool for ecotoxicological studies.

**Abridged English Version** — Biotransformation enzymes are involved in the metabolism of both pollutants and endogenous substrates (steroids). Among enzymatic systems implicated in biotransformation, there is a considerable interest in cytochrome P-450-dependent monooxygenase (MO) activities which have been characterized in liver and other tissues of many animals. Basal levels of MO activities can be greatly increased (induced) by xenobiotics such as polychlorobiphenyls, polyaromatic hydrocarbons and dioxins. Moreover, induction of MO activities can lead to toxicological consequences [2]. Thus, MO activities could be a valuable warning system allowing the detection of hazardous organic micropollutants at presumably toxic levels ([1], [5]). Biotransformation enzymes are often studied in primary culture of mammalian hepatocytes in pharmacological and toxicological experiments. The use of fish for ecotoxicological studies is now well established, but there is no work to consider the impact of pollutants on a cellular system such as a primary culture of hepatocytes.

The present study was undertaken to determine if cytochrome P-450 and MO activities could be measured in a primary culture of trout hepatocytes and if induction could be observed.

Hepatocytes were obtained following *in situ* perfusion of male rainbow trout liver with collagenase solution. Culture was performed in 60 mm diameter Petri dishes with  $0.3 \times 10^6$  cells per  $\text{cm}^2$  maintained at  $16^\circ\text{C}$  in minimum essential medium (MEM, SIGMA) buffered with HEPES (pH 7.65) and adjusted at 300 mosmoles [3]. Cytochrome P-450 was measured spectrophotometrically according to Omura and Sato [4] (Fig. 1). The measurement of two MO activities, 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD) and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), was carried out by addition of substrate to the culture medium (substrate concentrations were  $200 \mu\text{M}$  for ECOD and  $2 \mu\text{M}$  for EROD). Reaction was stopped by addition of trichloroacetic acid (final concentration: 2%, v/v). Conjugates were hydrolyzed by  $\beta$ -glucuronidase (16 hrs. at  $42^\circ\text{C}$ , pH 5.5). In the case of ECOD, the hydrolysate was

Note présentée par René TRUHAUT.

centrifuged, and 7-hydroxycoumarin was extracted from the supernatant with ethyl acetate then quantified fluorimetrically as previously described [5]. In the case of EROD, fluorimetric measurement was performed just after centrifugation [5].

Time course of cytochrome P-450 level and MO activities are given in Table. Cytochrome P-450 level decreased significantly until 48 hrs. of culture, then remained at a constant level (nearly 50% of the initial content). Only a slight decrease in ECOD and EROD activities was observed following 96 hrs. of culture (72 and 83% of the initial activities, respectively). With primary cultures of rat hepatocytes, many authors have observed a high unstability of cytochrome P-450 content and MO activities with time [6]. A better stability has been obtained by addition of compounds such as nicotinamide [7], metyrapone [8], dimethylsulfoxide [9] or hexobarbital [10] to the culture medium. From our results, addition of exogenous stabilizers is not necessary with primary cultures of trout hepatocytes. Nevertheless, the stability of ECOD and EROD activities seemed higher than the stability of cytochrome P-450 level. However, spectrophotometric analysis of cytochrome P-450 gives global levels without distinguishing between different isozymes. Thus, it is possible that cytochrome P-450 isozymes involved in deethylation of 7-ethoxycoumarin and 7-ethoxyresorufin were more stable than other ones, leading to a discrepancy between the time trend of global cytochrome P-450 level and those of particular MO activities.

Induction study was conducted by using a model inducer,  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF). Results (Fig. 2) showed that EROD and ECOD activities were induced by  $\beta$ -NF at concentrations in the medium ranging from 0.05 to 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . ECOD activity was induced in the same order of magnitude as after exposure of trout *in vivo* to  $\beta$ -NF and incubation of microsomal fraction with the substrate, while EROD activity was much less induced than *in vivo* (about 3-fold in hepatocyte system *versus* about 100-fold *in vivo*) [13]. In our work, concentrations higher than 0.5  $\mu\text{g}$   $\beta$ -NF/ml did not lead to induction (Fig. 2), and concentrations in the range of 5-10  $\mu\text{g/ml}$  (commonly used with rat hepatocytes) led to inhibition of ECOD and EROD (data not shown) suggesting a higher cytotoxicity of  $\beta$ -NF to trout hepatocytes than to mammal hepatocytes.

Our results show that primary cultures of trout hepatocytes seem to be a promising tool for studying the impact and the mechanism of action of pollutants on biotransformation enzymes, but further studies are needed to determine the limits and the optimal conditions of use of this system.

---

INTRODUCTION. — La présence de polluants dans le milieu aquatique expose les poissons à un grand nombre de xénobiotiques. Comme chez les mammifères, leur foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme de ces composés et les activités monooxygénases dépendantes du cytochrome P-450 y jouent un rôle important. Des molécules exogènes tels que les polychlorobiphényles (PCBs) et les hydrocarbures polyaromatiques augmentent le niveau basal de ces activités (phénomène d'induction). L'induction des monooxygénases peut servir d'indicateur de la pollution de l'eau [1], et de plus constitue la phase initiale de phénomènes de toxicité [2].

Chez les mammifères, les hépatocytes isolés ou en culture primaire sont couramment utilisés comme modèle expérimental pour l'étude des activités de biotransformation. Ces modèles, où le maintien de l'intégrité cellulaire est assuré, sont plus proches des conditions *in vivo* que les homogénats ou les fractions subcellulaires, de plus les expériences réalisées

sur des lots cellulaires homogènes sont comparables. Cette technique n'a pas encore été exploitée chez le poisson, malgré un intérêt écotoxicologique évident.

Nous avons développé une culture primaire d'hépatocytes de truite et nous avons éprouvé les capacités de ce modèle à exprimer des activités de biotransformation. Les résultats présentés ici concernent les mesures de la teneur en cytochrome P-450, de deux activités monooxygénases et de l'inductibilité de ces dernières après exposition des hépatocytes à un inducteur type, la  $\beta$ -naphtoflavone.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les hépatocytes obtenus par perfusion *in situ* de la truite arc-en-ciel mâle par une solution de collagénase, sont cultivés dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre à raison de  $0,3 \cdot 10^6$  cellules par centimètre carré. Les hépatocytes sont maintenus à 16°C dans un milieu minimal essentiel (MEM, SIGMA) tamponné à l'HEPES (pH 7,65) et ajusté à 300 mosmoles [3].

Le cytochrome P-450 est dosé par spectrophotométrie différentielle selon Omura et Sato [4] (fig. 1).

L'activité 7-éthoxycoumarine O-dééthylase (ECOD) est évaluée par addition de 7-éthoxycoumarine à 200  $\mu$ M dans le milieu de culture. Après 30 mn d'incubation à 16°C, les cellules sont rapidement collectées, soniquées (un échantillon de l'homogénat est prélevé pour le dosage des protéines) et transférées dans de l'acide trichloroacétique (2% final, v/v). Après centrifugation, le surnageant est ajusté à pH 5,5 et incubé 16 h à 42°C en présence de  $\beta$ -glucuronidase dans le but d'hydrolyser les molécules conjuguées. Après centrifugation et extraction par de l'acétate d'éthyle, le produit de la réaction (7-hydroxycoumarine) est mesuré par fluorimétrie (longueur d'onde d'excitation : 380 nm, longueur d'onde d'émission : 480 nm), en présence d'un mélange éthanol-tampon glycine (v/v) à pH 10,4. Le spectrofluorimètre est standardisé par de la 7-hydroxycoumarine. L'accumulation du produit est linéaire pendant au moins 1 h.

L'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) est mesurée après incubation des hépatocytes en présence de 7-éthoxyrésorufine à 2  $\mu$ M dans le milieu de culture. Après arrêt de la réaction par l'acide trichloroacétique, les molécules conjuguées sont hydrolysées comme décrit ci-dessus pour l'ECOD. Après centrifugation, la fluorescence de la résorufine est déterminée à partir du surnageant (longueur d'onde d'excitation : 537 nm, longueur d'onde d'émission : 583 nm). Le spectrofluorimètre est standardisé à l'aide d'une solution de résorufine. La réaction n'étant pas linéaire dans le temps, la mesure est effectuée après 5 mn d'incubation.

TABLEAU

Évolution de la teneur en cytochrome P-450 et des activités ECOD et EROD dans des hépatocytes de truite arc-en-ciel en culture primaire (moyenne de trois boîtes  $\pm$  écart-type).

*Time course of content of cytochrome P-450, ECOD and EROD activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes (mean of three dishes  $\pm$  standard deviation).*

|                                                 | Jours de culture |                |                |                |                |
|-------------------------------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                 | 0                | 1              | 2              | 3              | 4              |
| Cytochrome P-450 (pmole/mg protéines) . . . . . | 117 $\pm$ 19     | 93 $\pm$ 5     | 69 $\pm$ 1     | 68 $\pm$ 5     | 62 $\pm$ 5     |
| ECOD (pmole/mn/mg protéines) . . .              | 23,7 $\pm$ 1,0   | 23,3 $\pm$ 0,8 | 20,0 $\pm$ 1,5 | 15,6 $\pm$ 1   | 17,2 $\pm$ 1,5 |
| EROD (pmole/5 mn/mg protéines) .                | 37,8 $\pm$ 0,8   | 34,2 $\pm$ 2,2 | 33,8 $\pm$ 2,6 | 29,7 $\pm$ 2,2 | 31,6 $\pm$ 1,5 |

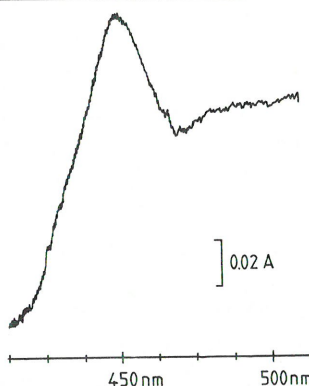


Fig. 1. — Spectre de différence du cytochrome P-450 obtenu suivant la méthode d'Omura et Sato.

*Fig. 1. — Difference spectrum of cytochrome P-450 according to Omura and Sato.*

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Le tableau présente l'évolution, en fonction du temps de culture, de la teneur en cytochrome P-450 et des deux activités monooxygénases ECOD et EROD. Ces deux activités sont classiquement étudiées chez les poissons et les mammifères et sont, de plus, inductibles par des polluants tels que les polychlorobiphényles [5].

La teneur en cytochrome P-450 diminue sensiblement pendant les premières 48 h puis se stabilise. Après 96 h, les hépatocytes contiennent encore 53 % de la teneur initiale mesurée sur cellules fraîchement isolées. Chez le rat, une des principales limites à l'utilisation d'une culture primaire d'hépatocytes est la perte rapide du cytochrome P-450 durant les premières heures, perte qui peut atteindre 88 % du taux initial au 4<sup>e</sup> jour [6]. Ces résultats ont amené des auteurs à stabiliser le taux de cytochrome P-450 par addition de nicotinamide [7], de métyrapone [8], de diméthylsulfoxyde [9] ou d'hexobarbital [10] dans le milieu de culture. Dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel, cultivés dans nos conditions, la teneur en cytochrome P-450 se maintient à un niveau satisfaisant sans l'ajout d'agents stabilisants.

La stabilité des activités ECOD et EROD est remarquable, puisque respectivement 72 et 83 % des valeurs initiales sont conservées après 96 h de culture (tableau). L'activité ECOD mesurée sur les cellules fraîchement isolées (jour 0) est comparable à celle mesurée sur des hépatocytes de truite arc-en-ciel maintenus en suspension [11]. A partir d'hépatocytes de rat, plusieurs auteurs ont observé une instabilité marquée de ces activités monooxygénases en fonction du temps [8], voire une disparition quasi totale de l'activité ECOD après 96 h de culture, cette chute d'activité pouvant être atténuée par addition de dexaméthasone et de nicotinamide dans le milieu [12]. Les niveaux des activités ECOD et EROD ont été comparés à ceux mesurés à partir de microsomes de truite arc-en-ciel par Goksoyr et coll. [15] : en considérant les activités exprimées non pas par rapport à la teneur en protéines (les protéines microsomiques et cellulaires n'ont pas la même signification) mais par rapport à la teneur en cytochrome P-450, on observe des valeurs similaires dans les deux systèmes pour les deux activités.

La stabilité dans le temps des niveaux des activités ECOD et EROD semble meilleure que celle de la teneur en cytochrome P-450 (tableau). En fait la mesure spectrophotométrique de la teneur en cytochrome P-450 apporte une valeur globale sans permettre une distinction entre les différents isozymes du cytochrome P-450. Il est donc possible que les isozymes participant aux activités ECOD et EROD soient plus stables que d'autres

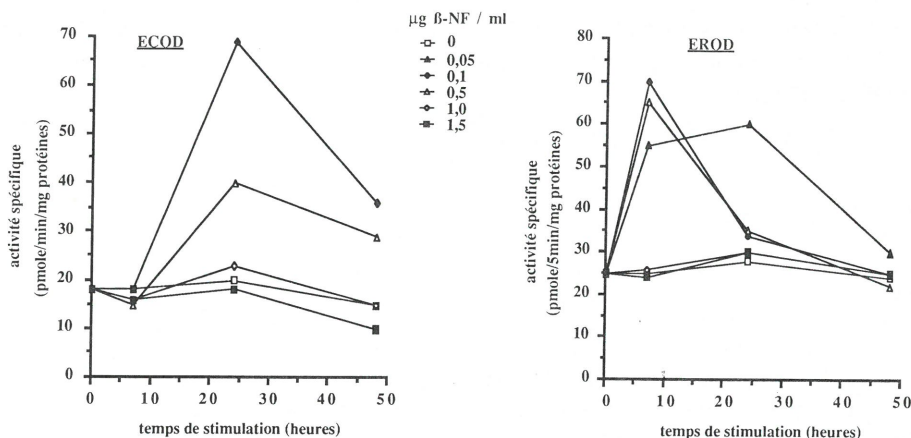


Fig. 2. — Effet de la présence de  $\beta$ -naphtoflavone ( $\beta$ -NF) dans le milieu de culture sur les activités ECOD et EROD. La  $\beta$ -NF a été ajoutée après 1 jour (EROD) ou 2 jours (ECOD) de culture; les activités ont été mesurées après 0, 7, 24 et 48 h de culture en présence de  $\beta$ -NF (moyenne de trois boîtes).

Fig. 2. — Effect of  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF) on ECOD and EROD activities in primary culture of rainbow trout hepatocytes.  $\beta$ -NF was added after 1 day (EROD) or 2 days (ECOD) of culture; activities were estimated after 0, 7, 24 and 48 hrs. in presence of  $\beta$ -NF (mean of three dishes).

n'intervenant pas dans ces réactions, ce qui se traduirait par une évolution temporelle différente de la teneur globale en cytochrome P-450, d'une part, et des activités ECOD et EROD, d'autre part.

Compte tenu du maintien des activités ECOD et EROD durant plusieurs jours, l'effet d'un inducteur classique, la  $\beta$ -naphtoflavone ( $\beta$ -NF), a été éprouvé dans notre culture primaire d'hépatocytes de truite (fig. 2). La présence de  $\beta$ -NF à des concentrations comprises entre 0,05 et 0,5  $\mu\text{g/ml}$  provoque l'augmentation des deux activités monooxygénases. L'induction maximale est constatée 7 h après l'ajout de  $\beta$ -NF pour l'EROD et après 24 h pour l'ECOD.

L'ampleur de l'induction peut être comparée à celle observée après exposition *in vivo* de la truite arc-en-ciel à la  $\beta$ -NF puis mesure des activités monooxygénases dans les microsomes hépatiques [13]: le taux d'induction de l'ECOD est tout-à-fait similaire (augmentation d'un facteur 3 à 4), mais il est beaucoup plus faible avec l'EROD (activité multipliée par 3 dans notre système, mais par 100 environ après exposition *in vivo*). Ceci pourrait être lié à l'instabilité de la 7-éthoxyrésorufine ou de la résorufine puisque l'apparition du produit n'est pas linéaire en fonction du temps.

Il est intéressant de constater que les hépatocytes de truite sont beaucoup plus sensibles que ceux de poulet [14] ou de lapin [15] à la présence d'inducteurs puisque, chez ces dernières espèces, des concentrations de  $\beta$ -NF de l'ordre de 10  $\mu\text{g/ml}$  sont nécessaires pour obtenir des taux d'induction équivalents [14]. Dans notre étude, les concentrations de  $\beta$ -NF supérieures à 0,5  $\mu\text{g/ml}$  n'ont pas modifié les activités ECOD et EROD (fig. 2), et des concentrations de l'ordre de 5 à 10  $\mu\text{g/ml}$  ont inhibé ces activités, suggérant une cytotoxicité de la  $\beta$ -NF supérieure pour les hépatocytes de truite que pour ceux d'autres espèces.

CONCLUSION. — Les résultats présentés ici montrent que la culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel permet l'expression et l'induction d'activités enzymatiques de biotransformation. La relative stabilité, durant plusieurs jours, du taux de cytochrome P-450 et du niveau des activités ECOD et EROD démontre qu'un tel système pourrait

être utilisable pour évaluer l'impact et les mécanismes d'action de polluants sur les activités de biotransformation des poissons. Les limites et conditions optimales d'utilisation restent néanmoins à définir.

Note remise le 19 septembre 1988, acceptée après révision le 9 décembre 1988.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. F. PAYNE, L. L. FANCEY, A. D. RAHIMTULA et E. L. PORTER, *Comp. Biochem. Physiol.*, 86 C, 1987, p. 233-245.
- [2] C. IOANNIDES et D. V. PARKE, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1987, p. 4197-4207.
- [3] J. L. MAITRE, L. MERCIER, L. DOLO et Y. VALOTAIRE, *In Vitro*, 22, 1985, p. 337-343.
- [4] T. OMURA et R. SATO, *J. Biol. Chem.*, 239, 1964, p. 2370-2378.
- [5] G. MONOD, A. DEVAUX et J.-L. RIVIÈRE, *Sci. Total Environ.*, 73, 1988, p. 189-201.
- [6] J.-M. BEGUE, C. GUGUEN-GUILLOUZO, N. PASDELOUP et A. GUILLOUZO, *Hepatology*, 4, 1984, p. 839-842.
- [7] A. J. PAINE, L. J. WILLIAMS et R. F. LEGG, *Life Sci.*, 24, 1979, p. 2185-2192.
- [8] B. G. LAKE et A. J. PAINE, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1982, p. 2141-2144.
- [9] S. F. MUAKKASSAH KELLY, F. BIERI, F. WAECHTER, P. BENTLEY et W. STÄUBLI, *Exp. Cell Res.*, 171, 1987, p. 37-51.
- [10] H. M. KIM, J. R. HA et S. K. YANG, *Drug Chem. Toxicol.*, 11, 1988, p. 29-41.
- [11] T. ANDERSSON et L. FÖRLIN, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1985, p. 1407-1413.
- [12] A. M. EDWARDS, M. L. GLISTAK, C. M. LUCAS et P. A. WILSON, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1984, p. 1537-1546.
- [13] A. GOKSOYR, T. ANDERSSON, T. HANSSON, J. KLUNGSOYR, Y. ZHANG et L. FÖRLIN, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89, 1987, p. 347-360.
- [14] P. KREMERS, dans *Hépatocytes isolés et en culture*, C. GUGUEN-GUILLOUZO et A. GUILLOUZO éd., Éditions I.N.S.E.R.M., 1986, p. 297-236.
- [15] M. DAUJAT, L. PICHARD, C. DALET, C. LARROQUE, C. BONFILS, D. POMPON, D. LI, P. S. GUZELIAN et P. MAUREL, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1987, p. 3597-3606.

C. V. et Y. V. : Laboratoire de Biologie moléculaire, campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex;

G. M. et J.-L. R. : 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.