

Etablissement d'une culture primaire de cellules cardiaques de palourde – Utilisation du bioessai pour évaluer l'impact d'une phycotoxine, l'acide okadaïque

Houda Hanana*, **Hélène Talarmin***, **Mickaël Droguet***, **Jean-Pierre Pennec***, **Pascale Marcorelles****, **Eric Gobin****, & **Germaine Dorange***

**IUT de Brest*

Département Génie Biologique - Rue de Kergoat - CS 93837 - 29238 Brest Cedex3

***CHU Brest, Hôpital Morvan, pôle de Biologie Pathologie, Service d'Anatomie pathologique / Département de médecine, Brest, F - 29609 France*

Houda.Hanana@univ-brest.fr ; Helene.Talarmin@univ-brest.fr ; Mickael.Droguet@univ-brest.fr ; jpennec@univ-brest.fr ; pascale.marcorelles@chu-brest.fr ; eric.gobin@chu-brest.fr ; Germaine.Dorange @univ-brest.fr

Sections de rattachement : 67/68
Secteur: Secondaire

RÉSUMÉ. Des cultures primaires de cellules cardiaques de palourde, *Ruditapes decussatus*, ont été établies au cours de cette étude. Parmi la population de cellules adhérentes, des cardiomyocytes, spontanément contractiles in vitro, ont été caractérisés par immunomarquage et par leurs propriétés électrophysiologiques. Ces primocultures ont été utilisées comme modèle expérimental pour évaluer l'effet d'une toxine algale, l'acide okadaïque (AO), sur la viabilité cellulaire estimée par le test MTT, sur les caractéristiques électrophysiologiques des cardiomyocytes étudiées par patch clamp et sur l'activation de la voie des MAP kinases P38 évaluée par technique ELISA. Les résultats obtenus montrent que l'AO, jusqu'à la concentration de 1000nM, n'a pas d'effet cytotoxique, après 24h de contact. En revanche, ce composé induit une augmentation des courants calciques entrants et une activation de P38, ce qui pourrait expliquer son absence de toxicité à l'égard des cellules cardiaques de palourde. Cette étude démontre l'intérêt des cultures primaires de cellules cardiaques de palourde comme méthode alternative pour évaluer les effets de xénobiotiques du milieu marin.

MOTS-CLÉS : Palourde, cardiomyocytes, in vitro, acide okadaïque, électrophysiologie

1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, la culture de cellules d'invertébrés marins et plus particulièrement celle d'espèces commerciales, a été tentée dans le but de développer des bioessais pour des applications en immunologie, pathologie microbienne, toxicologie... (cf. revues de Mialhe *et al.*, 1988 ; Le Marrec-Croq 1995 ; Droguet 2006). Ce sont les bivalves et tout particulièrement les huîtres (Le Marrec-Croq 1995 ; Cheng *et al.*, 2001 ; Pennec *et al.*, 2002 et 2004 ; Talarmin *et al.*, 2008), les moules (Rank and Jensen 2003) et les palourdes (Wen *et al.*, 1993 ; Ross Ellington 1993) qui ont été les plus fréquemment utilisés pour essayer d'établir des cultures.

Les recherches menées au laboratoire ont permis d'établir des primocultures de cellules de cœur de coquille Saint-Jacques (Le Marrec-Croq *et al.*, 1998 et 1999) et d'huître (Pennec *et al.*, 2002 et 2004, Talarmin *et al.*, 2008). Le présent travail a pour objectif de mettre en place des cultures primaires de cellules cardiaques de palourde et de les utiliser pour évaluer l'impact d'une toxine algale, l'acide okadaïque (AO). Ce composé, produit majoritairement par une microalgue du genre *Dinophysis*, peut contaminer les mollusques (Torgersen *et al.*, 2005). L'ingestion des coquillages contaminés par cette phycotoxine de type DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) provoque chez l'homme des troubles gastro-intestinaux. Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié l'effet de cette biotoxine sur la viabilité cellulaire, l'activation de la MAP kinase P38 et sur les propriétés électrophysiologiques des cardiomyocytes.

2. Matériels et méthodes

Les palourdes (*Ruditapes decussatus*) sont débarrassées par brossage de leur épifaune, lavées par de l'eau de mer stérile, désinfectées à l'alcool, puis ouvertes par section du muscle adducteur, dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Le cœur est prélevé et dissocié selon le protocole de Le Marrec-Croq *et al* (1998, 1999). La viabilité des cellules isolées est évaluée par le test d'exclusion du bleu trypan. Les cellules sont ensemencées à raison de $8,5 \times 10^5$ cellules/cm² dans un milieu de culture défini par Le Marrec-Croq *et al* (1997). Les cultures de cellules cardiaques de palourdes sont mises à incuber à 20°C. Après 3 jours, le milieu est renouvelé puis il est changé tous les deux jours pendant la durée des expériences.

Immunocytochimie - Les cellules fixées au méthanol, sont mises à incuber en présence des anticorps (Ac) primaires, respectivement l'anti-troponine 1:200 (Santa Cruz biotechnology), l'anti- α -actinine sarcomérique 1:400 (Sigma), l'anti-tropomyosine sarcomérique 1:50 (Sigma) et l'anti-myosine 1:10 (Sigma). Le kit NiewTM DAB detection (Ventana Medical Systems) est utilisé pour la révélation. Le marquage se fait en utilisant l'automate Ventana Medical Systems.

Préparation de l'AO - L'AO, isolé du dinoflagellé *Prorocentrum concavum* (Alexis Biochemicals) est solubilisé dans du DMSO 1/4000 (Dimethyl Sulfoxyde).

Viabilité cellulaire - Elle est appréciée par le test MTT. Ce test repose sur la réduction, par les succinate-déshydrogénases mitochondriales, du MTT (bromure de 3 - (4,5 diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 diphényl tétrazolium), composé jaune, en formazan de couleur bleue. Après extraction au DMSO, l'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

Patch clamp – Après 4 jours de culture, les mesures électrophysiologiques sont effectuées sous microscope inversé relié à un écran de contrôle *via* une caméra. La technique est effectuée selon le protocole décrit par Pennec *et al* (2004). Les enregistrements montrent le courant mesuré en fonction du temps pour différents échelons de potentiels imposés.

Test ELISA - Les cellules sont incubées en présence d'AO à 500nM pendant 2h et 6h. Après lavage en tampon phosphate (PBS) les cellules sont lysées dans un tampon d'extraction (TBS-EDTA 1mM, pH 7,8). Les extraits cellulaires sont centrifugés (13000g, 10 min, 4°C). Le dosage de protéines est réalisé sur les surnageants selon la méthode de Bradford. Pour chaque échantillon, 20µg de protéines sont déposés par puits dans une plaque 96 puits. Après adsorption sur le support et une étape de saturation par de la sérum albumine bovine en PBS 3% à 4°C pendant 12h, les cellules sont lavées par du PBS-Tween 20 (0,05 %) et mises à incuber pendant 1h à température ambiante avec l'Ac primaire polyclonal-IgG de lapin dirigé contre la P38 phosphorylée (PP38) (Thr 180/Tyr 182), dilué au 1/2000. Après lavage au PBS-Tween 20 (0,05 %), les cellules sont traitées pendant 30 min par un Ac secondaire de chèvre anti IgG de lapin (H + L) conjugué à la peroxydase (1/10000). Suite à l'addition du substrat, le tétraméthylbenzidine, l'absorbance, proportionnelle à la quantité de PP38, est déterminée à 450nm.

3. Résultats

3.1. Observation morphologique des cellules cardiaques en culture

A l'issue de la dissociation, un bon rendement est obtenu ; il est de l'ordre d'un million de cellules/cœur. Les cellules isolées commencent à adhérer après 48h de culture à 20°C. La population cellulaire est hétérogène ; elle est composée de cellules fibroblastiques, de type épithélial et de cellules arrondies (figure 1).

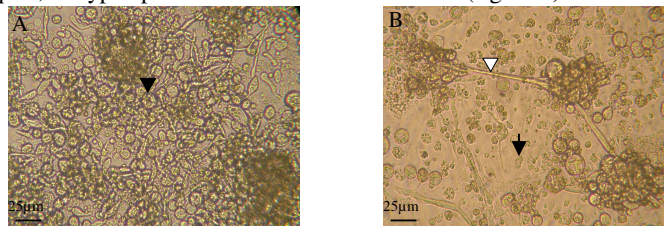


Figure 1. Culture primaire de cellules cardiaques de palourde. Cellules de type épithélial (▲), fibroblastiques (▽), arrondies (▼).

La culture s'organise en foyers entourés de nombreuses cellules rondes. Les réseaux de cellules allongées contractiles apparaissent après 72h de culture et persistent au moins pendant 1 mois.

3.2. Immunocytochimie

Les études immunologiques sont réalisées sur des cultures de 4 jours. Seules les cellules fibroblastiques sont fortement marquées par l'Ac anti-troponine et plus modérément par les Ac dirigés contre l' α -actinine sarcomérique, la tropomyosine et la myosine (figure 2).

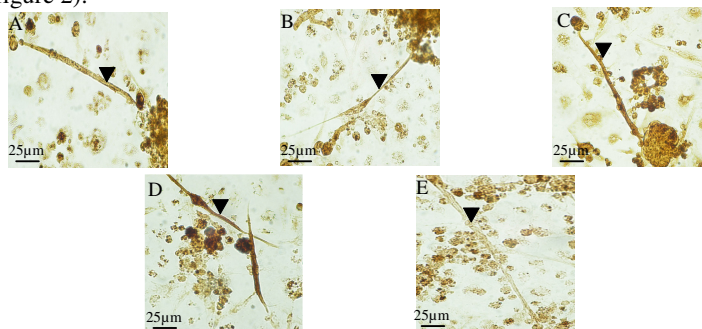


Figure 2. Immunomarkage des cardiomyocytes (▼) par les Ac anti-tropomyosine (A), anti α -actinine sarcomérique (B), anti-myosine (C) et anti-troponine (D). Contrôle négatif (E).

3.3. Fréquence de contraction des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes en culture se contractent spontanément après 3 jours. La figure 3 montre l'évolution du rythme de contractions des cellules pendant les 15 premiers jours de culture. La fréquence de contraction des cardiomyocytes de palourdes *in vitro* reste stable au cours du temps, de 15 ± 2 battements/min (bpm) ; elle est similaire à celle mesurée *in vivo* à la même température (14 ± 3 bpm).

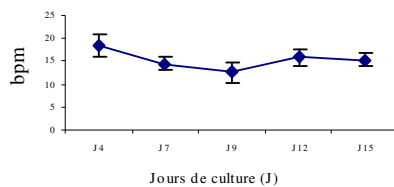


Figure 3. Evolution du rythme de contraction spontanée des cardiomyocytes *in vitro* sur une période de 15 jours.

3.4. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire

Les résultats du test MTT mis en œuvre pour apprécier la viabilité des cellules sont résumés sur la figure 4. Quels que soient la concentration d'AO testée et le temps d'exposition, aucun effet négatif sur la viabilité cellulaire n'est constaté après 2 expérimentations (6 réplicats par condition expérimentale dans chaque cas). Des essais complémentaires sont en cours pour pouvoir réaliser une analyse statistique des données.

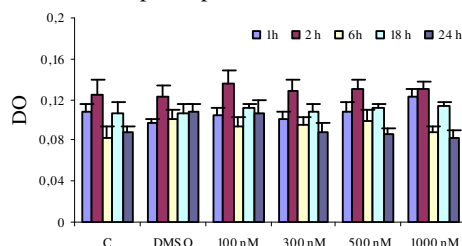


Figure 4. Etude de la viabilité de cellules de cœur exposées à l'AO pendant différents temps et à différentes concentrations (test MTT). (C) : cellules non exposées à la toxine. DMSO : cellules témoins exposées au DMSO 4 %.

3.5. Effet de l'AO sur les caractéristiques électrophysiologiques des cardiomyocytes

Par la technique du patch - clamp, des courants ioniques voltage - dépendants ont été enregistrés (figure 5A) ; leur intensité est fonction des potentiels imposés (figure 5D). Après 15 min d'exposition à l'AO, une augmentation des courants entrants (figure 5B) est observée. L'inhibition de ces courants par le vérapamil (figure 5C) montre qu'il s'agit de courants calciques.

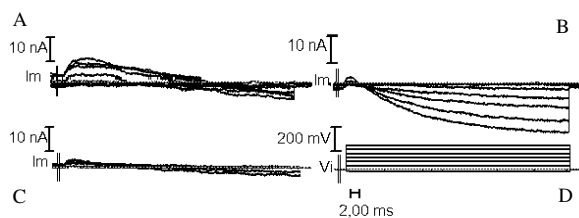


Figure 5. Effet de l'AO sur le courant calcique de cardiomyocytes de palourde. A) Courants ioniques totaux enregistrés chez des cellules non traitées par l'AO - B) Effet de l'AO (125 nM) sur les courants ioniques - C) Inhibition des courants calciques par addition de vérapamil à 10^{-3} M - D) Tensions imposées.

3.6. Effet de l'AO sur l'activation de P38

Dans les cellules exposées à l'AO 500nM pendant 2h et 6h, une nette activation par phosphorylation de P38 (40 %) est constatée par comparaison aux cellules témoins (C) non traitées (figure 6).

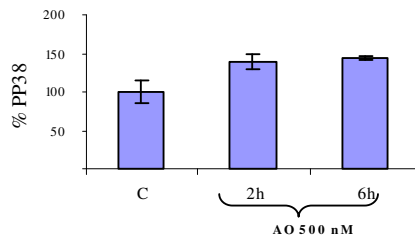


Figure 6. Effet de l'AO après 2h et 6h sur la phosphorylation de la MAP kinase P38 (PP38). C : témoin non exposé à la phycotoxine.

4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'établir une culture primaire de cellules cardiaques de palourde et de l'utiliser comme modèle expérimental pour évaluer l'effet d'une biotoxine, l'acide okadaïque.

Un bon rendement ainsi qu'une viabilité supérieure à 90 % sont obtenus à l'issue de la dissociation enzymatique. Après mise en culture, trois types de cellules adhèrent au support. Parmi les cellules adhérentes, nous avons démontré que les cellules fibroblastiques sont des cardiomyocytes caractérisés par leur capacité à se contracter spontanément *in vitro*, par leur immunoréactivité à l'égard des anticorps testés et par leurs caractéristiques électrophysiologiques identiques à celles des cellules atriales d'huître notamment (Pennec *et al.*, 2004). Ces cardiomyocytes restent fonctionnels en culture pendant au minimum 1 mois autorisant des tests de toxicité *in vitro*.

Si un effet cytotoxique de l'AO a été démontré dans des lignées de cellules humaines (Rami *et al.*, 2003) ou pour des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Singh *et al.*, 2000), tel n'est pas le cas pour les cellules cardiaques de palourde pour les conditions expérimentales choisies dans le cadre de ce travail, même dans le cas d'une exposition à une concentration forte de 1 μ M pendant 24 heures. Des résultats identiques ont été obtenus pour les cellules atriales d'huître (Talarmin *et al.*, 2008).

L'absence de toxicité peut être due à l'activation de la MAP kinase P38 *et/* ou à l'augmentation des courants calciques telles que démontrées après 6h d'exposition à 500nM d'AO. Cette nette activation de P38 par phosphorylation, qui s'explique par l'inhibition des phosphatases PP1 et PP2A par l'AO, pourrait en effet protéger les cellules de l'apoptose comme l'ont montré Zechner *et al* (1998) pour les myocytes

ventriculaires de souris. Il se pourrait aussi que l'inhibition de PP2A active la voie de signalisation Akt impliquée dans la survie cellulaire (Yasuoka *et al.*, 2004).

En ce qui concerne l'augmentation des courants calciques entrants que nous avons observée dans les cardiomyocytes de palourde exposés à l'AO, telle que constatée pour des cardiomyocytes de grenouille (Frace and Hartzell 1993), ou de cochon d'Inde (Wiechen and Herzid 1995), elle pourrait être corrélée à l'inhibition des phosphatases par la toxine (Frace and Hartzell 1993) et/ou à l'activation des PKCs, protéines kinases connues pour réguler les courants calciques (DuBell and Rogers 2004 ; Talarmin *et al.*, 2008).

Les résultats de cette étude montrent que les cultures primaires de cellules cardiaques de palourde présentent un intérêt comme biotest complémentaire des modèles expérimentaux déjà disponibles pour étudier les mécanismes d'action de xénobiotiques polluants du milieu marin (Devauchelle 2002).

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un contrat de recherche européen - Acronym BIOTOXmarin.

Bibliographie

Cheng, T.C., La Peyre, J.F., Buchanan, J.T., Tiersch, T.R. and Cooper, R.K. (2001). Cryopreservation of heart cells from the eastern oyster. *In Vitro Cell. Dev. Biol - Anim.* 37 : 237-244.

Devauchelle, N. (2002). Bilan de santé des organismes et des écosystèmes marins. Bilan et prospective – IFREMER ed : 43 p.

Droguet, M. (2006). Etude des caractéristiques fonctionnelles des cardiomyocytes d'huître en culture. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France : 211 p.

DuBell, W.H. and Rogers, T.B. (2004). Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca²⁺ current in mouse cardiac myocytes. *J. Physiol.* 556 : 79-93.

Frace, A.M. and Hartzell, H.C. (1993). Opposite effects of phosphatase inhibitors on L-type calcium and delayed rectifier currents in frog cardiac myocytes. *J. Physiol.* 472 : 305-326.

Le Marrec-Croq, F. (1995). Etablissement de cultures primaires de cellules de bivalves marins. Thèse de Doctorat d'Océanologie Biologique de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France : 178 p.

Le Marrec-Croq, F., Dorange, G. and Chesné, C. (1997). Procédé de culture de cellules d'invertébrés marins et cultures obtenues, Brevet Fr n°9506921 ; n° de publication : 2735146 (1996).

Le Marrec-Croq, F., Fritayre, P., Chesné, C., Guilouzo, A. and Dorange, G. (1998). Cryopreservation of *Pecten maximus* heart cells. *Cryobiology.* 37 : 200-206.

- Le Marrec-Croq, F., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C., Chesné, C., Guillouzo, A., Boulo, V. and Dorange, G. (1999). Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (mollusca-bivalvia). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35 (5) : 289-295.
- Mialhe, E., Boulo, V. and Grizel, H. (1988). Bivalve mollusc cell culture. American Fisheries society Special Publication. 18 : 311-315.
- Pennec, J.P., Gallet, M., Gioux, M. and Dorange, G. (2002) Cell culture of bivalves : tool for the study of the effects of environmental stressors, *Cell. Mol. Biol.* 48 (4) : 351-358.
- Pennec, J.P., Talarmin, H., Droguet, M., Girous-Metgès, M.A., Gioux, M. and Dorange G. (2004) Characterization of the voltage-activated currents in cultured atrial myocytes isolated from the heart of the common oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* 207 (Pt 22) : 3935-3944.
- Rami, B.G., Chin, L.S., Lazio, B.E. and Singh, S. K. (2003). Okadaic-acid-induced apoptosis in malignant glioma cells. *Neurosurg. Focus.* 14 (2) : e4.
- Rank, J. and Jensen, K. (2003). Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 54 : 323-329.
- Ross Ellington, W. (1993). Studies of intracellular pH regulation in cardiac myocytes from the marine bivalve mollusk, *Mercenaria campechiensis*. *Biol. Bull.* 184 : 209-215.
- Singh, K., Communal, C. and Colucci W.S. (2000). Inhibition of protein phosphatase 1 induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes: role of adrenergic receptor stimulation, *Basic Res. Cardiol.* 95 : 389-396.
- Talarmin, H and Droguet, M., Pennec, J.P., Schröder, H.C., Muller, W.E.G., Gioux, M. and Dorange G. (2008). Effects of a phycotoxin, okadaic acid, on oyster heart cell survival. *Toxicol. Environ. Chem.* 90 (1) : 153-168.
- Torgersen, T., Aasen, J. and Aune, T. (2005) Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from brown crabs (*cancer pagurus*) in Norway. *Toxicon.* 46 (5) : 572-580.
- Wen, C.M., Kou, G.H. and Chen, S.N. (1993). Cultivation of cells from the heart of the hard clam *Meretrix lusoria* (Röding). *J. Tiss. Cult. Meth.* 15 : 123-130.
- Wiechen, K., Yue, D.T. and Herzig S. (1995). Two distinct functional effects of protein phosphatase inhibitors on guinea-pig cardiac L-type Ca²⁺channels. *J. Physiol.* 484 (3) : 583-592.
- Yasuoka, C., Ihara, Y., Ikeda, S., Miyahara, Y., Kondo, T. and Kohno, S. (2004). Antiapoptotic activity of Akt is down-regulated by Ca²⁺ in Myocardial H9c2 Cells. Evidence of Ca²⁺-dependent regulation of protein phosphatase 2Ac. *J. Biol. Chem.* 279 (49) : 51182-51192.
- Zechner, D., Craig, R., Hanford, D.S., McDonough, P.M., Sabbadini, R.A., Glembotski C.C. (1998). MKK6 activates myocardial cell NF-KappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 273 (14) : 8232-8239.