



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université de Tunis El Manar
Faculté des sciences de Tunis
Ecole doctorale des Sciences et
Technologies du Vivant et Sciences
de la Terre (STVST)



Université de Lorraine
Faculté de médecine-
Vandoeuvre - lès - Nancy
Ecole Doctorale BioSE
(Biologie-Santé-Environnement)

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Entre

L'université de Tunis El Manar

&

L'université de Lorraine

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'université de Tunis El Manar et de L'université de Lorraine

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Rym BEN AMMAR**

**« Ostéogénie, intégration et qualité de la nacre d'un bivalve des
côtes tunisiennes : *Pinctada radiata* (Leach, 1814) »**

Le 15 décembre 2014

Membres du jury :

Président : M. Mohamed EL GAZZAH PU - LR 11 ES 09- Université de Tunis El Manar, FST, Tunis.

Rapporteurs : M. Mohamed Salah ROMDHANE PU - UR Ecosystèmes et Ressources Aquatiques, INAT, Tunis.
M. Patrice LAQUERRIERE PU - UMR CNRS 7178 équipe IMABIO, IPHC, Strasbourg.

Examineurs : M. M'Hamed EL CAFSI PU - UR 13 ES 35 - Université de Tunis El Manar, FST, Tunis, Directeur de thèse.
M. Pierre GILLET PU - UMR 7365 - CNRS-UL IMoPA et UTCT (CHU), Nancy, Co-Directeur de thèse.
Mme. Marthe ROUSSEAU CRI, UMR 7365 - CNRS-UL IMoPA - Nancy, Co-Encadrante de thèse.

Université de Tunis El Manar. Faculté des Sciences de Tunis, Département de Biologie, Unité de Physiologie et Environnement Aquatique UR 13 ES 35, Campus Universitaire, El Manar II, 2092, Tunis, Tunisie.

UMR 7365 - CNRS-Université de Lorraine. Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) Biopôle de l'Université de Lorraine - Campus biologie-santé. 9, Avenue de la Forêt de Haye - B.P. 184. 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex. France.

WHEN YOU FEEL YOU CAN'T

TAKE IT ANYMORE.

TAKE IT TO GOD

AND GIVE

IT TO HIM.

NOTHING IS TO BIG

OR TO SMALL

FOR GOD TO HANDLE.

Avant-propos

Dans le cadre d'une thèse en cotutelle internationale, ce travail a été réalisé à l'Unité de Physiologie et Environnement Aquatique UR 13 ES 35, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis (TUNISIE) en collaboration avec l'équipe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Imagerie Vectorisation " (CeTEVI), UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Faculté de médecine, Nancy (France).

Dédicaces et remerciements

Dédicaces

Je me souviens d'un après-midi de l'été 2008 au cours duquel ma chérie maman et moi nous prenions un café ensemble dans la terrasse elle avait une fracture au niveau du bassin. C'était ma dernière année de master, en papotant je lui expliquais le système académique Maitrise-Master-Doctorat. Je me souviens qu'elle m'a dit « je crois en toi alors, dans 4 ans, tu pourrais déjà être docteur ? ». Ensuite la conversation a tourné autour de nos rêveries sur ce terme très suggestif mais qui en réalité ne voulait pas dire grande chose pour nous, ainsi que sur les sujets de recherche qui m'intéressaient et parmi lesquels la nacre, substance naturelle pouvant substituer l'os et une solution pour combler les failles osseux, en pensant en particulier à la fracture au niveau du bassin de ma mère, était ma principale aspiration.

Nous voici six ans plus tard, je n'ai pas vu le temps passer et j'ai du mal à réaliser que cet objectif très vague et rêveur soit devenu une réalité.

***Maman**, je ne sais pas comment te remercier si ce n'est qu'en te dédiant cette thèse, je sens et je sais que tu seras heureuse, que Dieu pourrait t'accorder une bonne action dans sa miséricorde infinie.*

A mon tout, Papa

Pour qui ce travail symbolise (enfin.. !) l'aboutissement heureux de dures années de travail, doutes, espoirs et encouragements, Papa, merci d'avoir été là, merci pour tes encouragements et pour la motivation que tu m'as toujours insufflée. J'espère que tu seras fier de moi

A ma famille, qui m'est si précieuse

A Imtinen

Ma chère soeur, qui a su être une amie et une mère à tous les instants, m'a supportée et m'a apporté son soutien. Je te souhaite tout le bonheur du monde.

*A **Manel**, à **Kais**, à **Rabiia** Pour votre soutien et vos encouragements. Avec tout mon amour. Un câlin à **Tita**...et un clin d'œil à **Améni** mon aimable nièce*

Espérant que cette thèse puisse être à la hauteur de tout ce qu'ils ont fait pour moi

Remerciements

Pendant le déroulement de ma thèse, j'ai rencontré beaucoup de personnes agréables, j'ai appris beaucoup, scientifiquement et humainement. Cette thèse restera dans ma mémoire comme le souvenir d'une période riche en événements. Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux qui, par leur aide directe ou indirecte, ont rendu sa réalisation possible.

A Monsieur le Professeur Mohamed EL GAZZAH

Qui nous fait l'honneur de présider notre jury.
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Patrice LAQUERRIERE

De l'Institut Pluridisciplinaire HUBERT CURIEN à Strasbourg.
Qui a aimablement accepté de participer à notre jury de thèse,
Veuillez accepter tous nos sincères et vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur Mohamed Salah ROMDHANE

De l'Institut National de l'Agriculture de Tunis
Qui a accepté de participer à notre jury de thèse,
Veuillez accepter notre profonde reconnaissance et tous nos sincères remerciements.

Je dois également remercier toutes les personnes qui ont permis à cette thèse d'avoir lieu et qui l'ont vécu « en direct ». Tout d'abord, monsieur le professeur **M'Hamed EL CAFSI**, qui a été un excellent directeur de thèse, me donnant toujours de la liberté tout en étant disponible et à l'écoute. Je tiens à vous exprimer mon profond respect et ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de votre laboratoire. Pour votre rigueur, votre professionnalisme et pour m'avoir fait une place au sein de votre équipe. Merci pour ces discussions stimulantes lors des réunions relativement régulières malgré des emplois du temps souvent incompatibles.

Merci également pour l'aide précieuse notamment en instrumentation. Je vous remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses et fructueuses au cours de ce travail qui nous mènent même à inventer de nouvelles théories scientifiques, merci de m'avoir communiqué votre passion pour les lipides particulièrement du monde marin, de m'avoir laissé une liberté d'action tout au long de ces quatre années qui m'a donné la force d'avancer et de rêver et d'avoir été présent dans les moments délicats. Merci pour vos encouragements pour rédiger mes articles. Merci pour votre générosité et votre humanisme. Ce fut très enrichissant de travailler sous votre direction.

J'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect à mon co-directeur de thèse à Nancy, Monsieur le professeur **Pierre GILLET**, pour ses précieux conseils scientifiques, ainsi que pour son aide précieuse, son soutien, sa disponibilité, son encadrement tout au long de ces années. Qu'il soit également remercié de la confiance qu'il m'a témoignée. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de votre laboratoire. Depuis mon intégration dans votre équipe, vous m'avez apporté sans réserve, toute l'aide scientifique, morale et matérielle qui m'a été nécessaire, le témoignage de ma reconnaissance, mon respect le plus profond et mon plus grand estime pour vos qualités scientifiques et humaines.

Je vous remercie particulièrement pour avoir toujours répondu à mes questions et corrigé mon travail. Vos conseils et votre compétence scientifique m'ont été d'une aide précieuse. Soyez assuré de toute ma reconnaissance d'avoir accepté mon encadrement.

Au docteur **Marthe ROUSSEAU** ma Co-encadrante de thèse à Nancy, pour sa bonne humeur, son enthousiasme, son sérieux, sa réactivité et son implication dans la valorisation de ce travail, pour m'avoir guidée, supportée, conseillée, corrigée, recorrectée et encouragée tout au long de ce travail. Merci également pour ta patience, ton authenticité et ta cordialité. Ce fut une formidable expérience de travailler avec quelqu'un d'aussi passionné et expérimenté que toi! Qui m'a tant appris à mon arrivée ! Ta compétence, ta disponibilité et ta gentillesse m'ont permis de surmonter bien des étapes. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et d'avoir travaillé avec toi. Je te remercie d'avoir été ma directrice de thèse. Merci pour tes précieux conseils, ta disponibilité et ton accompagnement de tous les jours. Ta bonne humeur générale et ta jovialité ont été très appréciables.

Je ne peux ne pas remercier Madame **Evelyne LOPEZ** Professeur émérite connue pour ses travaux précieux sur la nacre. Je lui dois une particulière reconnaissance pour l'intérêt bienveillant qu'elle a accordé à mon travail et pour la confiance qu'elle m'a accordée j'espère qu'elle m'honore avec son assistance à Tunis.

Cette thèse a également été réalisée en collaboration avec des équipes étrangères à Torrè Del Salte à Valence en Espagne. Je remercie particulièrement monsieur le professeur **Juan Carlos NAVARRO TARREGA** pour sa collaboration.

Il m'est également de remercier vivement mon collègue le docteur **Mohamed Ali BEN SMIDA** pour son aide, son sérieux, ses conseils importants et les multiples discussions fructueuses que nous avons eu au cours de ce travail.

Je remercie également tout le personnel du laboratoire nos techniciens **Hédi BEN REBAH** et **Hassan MEJRI** pour leur aide et les bons moments de fou rire que nous avons passé ensemble. Mes collègues en particulier **Nabila GHAZALI** pour son aide à réaliser la partie pratique et **Douha BOUSSOUFA** pour son humeur agréable et son aide, **Imène CHETWI** pour sa serviabilité et les bons moments que nous avons passé ensemble ainsi que **Khouloula TELAHIGUE**, **Imen REBAH** et **Mariem TIR** pour leurs conseils et aide, etc.....

Marie Hélène PIET, « véritable mère adoptive ». Qu'aurais-je fait sans tes conseils judicieux autant d'ordre biologique que technique. Merci d'avoir été là pour moi dans les moments plus « rushants ». Merci pour ta générosité et ton humanisme. Marie, toujours là pour aider. .. Merci Marie pour ta disponibilité et ton altruisme. Tu m'auras « sauvée », plusieurs fois, de bien des difficultés! J'aurais aimé que tu sois parmi nous et pour te faire découvrir un peu Tunis.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur **Jacques MAGDALOU**, ancien directeur de l'UMR CNRS jusqu'à 2012, ainsi à Monsieur **Jean Yves JOUZEAU**, directeur actuel de l'UMR CNRS 7365, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche et pour leurs gentillesse.

Je tiens à remercier monsieur le Docteur **Pascal REBOULT** pour son accueil dès le premier jour, son humour, pour ses conseils en culture cellulaire et différentes manipulations, ainsi que Monsieur le Docteur **Arnaud BIANCKI**, Ingénieur de Recherche, pour sa bonne humeur et son aide.

Mesdames **Ghislaine CAUCHOIS**, **Monique GENTILS**, et **Brigitte GUERBER**, pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

A tout le personnel du laboratoire ainsi à mes collègues et en particulier **Alice** pour son aide, son sérieux et surtout sa rapidité, **Loïc**, **Nasser**, **Alexandra**, **Jean Marc** pour leur aide. **Myriam**, **Lina TABCHEH**, **Nicolas**, **Magalie HUDZIA** et **Ayra SADEGH** pour m'avoir encouragés et supportés durant ces années et surtout les bons moments que nous avons passés ensemble.

Je voudrais aussi remercier de tout mon coeur mes meilleurs amis, tout particulièrement, **Mohamed**, **Nébil**, **Souad**, **Mourad**, **Rimel** et **Salma** pour leur encouragement et leur motivation. **Walid**, pour ton amitié sincère et ta présence même si tu es loin. **Wahid**, sans ton aide, mon ordinateur aurait fini par la fenêtre.

Merci d'avoir cru en moi à chaque seconde et de m'avoir épaulée, supportée et redressée dans les moments difficiles.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Ben Ammar Rym; Mohamed Ali Ben Smida; Marthe Rousseau; Pierre Gillet & M'hamed El Cafsi ; 2012. Etude de la composition en acides gras des phospholipides de la Poudre de nacre et de la chair de *Pinctada radiata* des côtes Tunisiennes. *Bulletin de l'Institut National des Sciences de la Mer (INSTM Salammbô), Tunisie* ; 16 :84-89.

Ben Ammar Rym, Mohamed Ali Ben Smida, Marthe Rousseau, Pierre Gillet & M'hamed El Cafsi; 2014. Lipid Characterization of Wild Species *Pinctada radiata* in Southern Tunisia East. *Intern J of engineering Sciences & Research Technology*, 3(4): 4060-4072.

Ben Ammar Rym; 2014. Study of the lipid composition of the flesh and the mother of pearl (nacre) of the pearl oyster *Pinctada radiata* (Leach, 1814) of Tunisian coast. *Inter J of a Sci and Tech Rese*; Issue 4 vol 3:464-482.

Mohamed Ali Ben Smida; **Rym Ben Ammar**; Hassen Mejri; M'Hamed El Cafsi, 2014. Fatty Acid Composition in Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Triacylglycerol and Diacylglycerol of the Muscle and Skin Swordfish (*Xiphias Gladius*). *IJESRT*; Vol.3, No. 8: 259 – 266.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont donné lieu aux communications orales suivantes:

Quatorzième Journée de l'Association Tunisienne des Sciences de la Mer (Sousse : Tunisie 18-21 décembre 2012. Ben Ammar Rym (1, 2)*; Mohamed Ali Ben Smida (1); Marthe Rousseau (2); Pierre Gillet (2) & M'hamed El Cafsi (1). «Etude de la composition en acides gras des phospholipides de la poudre de nacre et de la chair de *Pinctada radiata* des côtes tunisiennes» (avec un prix).

Journée de la FR CNRS-UL 3209 BMCT « Ingénierie Cellulaire & Thérapeutique » (Nancy : 11 septembre 2014. Ben Ammar R. *, Piet M.H., Brion A., El Cafsi M. *, Gillet P., Rousseau M. « Etude de l'effet des lipides extraits de la chair et de la nacre de l'huître *Pinctada radiata* sur les cellules MC3T3 »).

Résumé

La couche de nacre de la coquille de l'huître perlière *Pinctada radiata* des côtes tunisiennes est considérée comme un biomatériau ostéogénique prometteur. L'objectif de ce travail intitulé « Ostéogénie, intégration et qualité de la nacre d'un bivalve des côtes tunisiennes : *Pinctada radiata* (Leach, 1814) » consiste dans un premier temps à valoriser l'espèce *P. radiata* par sa qualité nutritionnelle par un suivi saisonnier de la composition de sa chair en lipides totaux et en phospholipides particulièrement les PC, PE, PS et PI. Les analyses effectuées ont montré que les lipides de *P. radiata* sont caractérisés par une richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 qui dépasse 3 fois celle des AGPI de la série n-6. Ces AGPI de la série n-3 en particulier l'EPA (C20:5n-3) et le DHA (C22:6n-3), sont connus comme étant les AG les plus importants dans l'alimentation humaine puisqu'ils préviennent des maladies cardiovasculaires et des pathologies ostéo articulaires,

Par ailleurs, *P. radiata* de la région de Maharès présente la meilleure qualité de nacre en Tunisie. Les analyses biochimiques ont montré que cette région, constitue la meilleure localisation de cette espèce qui est loin des zones portuaires et des différentes origines de stress (pêche, exploitation, zone touristique etc...). En plus de cet aspect, la zone de Maharès renferme des pintadines présentant une bonne qualité en termes d'épaisseur de nacre. Nos résultats montrent que la composition, saisonnière, en acide gras des phospholipides et en particulier des glycérophospholipides (PE, PI, PS et PC) de la nacre est riche en acides gras saturés C14 :0, C16 :0 et C18 :0 particulièrement en hiver et dans un moindre degré au printemps. La nacre, substance ostéogénique, a été également caractérisée par un taux élevé de plusieurs AGPI de la série n-3 et n-6, particulièrement (18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3 et le 20:4n-6).

Pour démontrer les potentialités ostéogéniques des extraits de la nacre, nous avons utilisé un modèle "in vitro" utilisant 4 extraits lipidiques : l'extrait lipidique de la nacre de *P. radiata* (Ln), l'extrait lipidique de la chair de *P. radiata* (Lc), l'ESM (Ethanol soluble Matrix) de la nacre de *P. radiata* (Br) et l'ESM de la nacre de *P. margaritifera* (Bm). Nous avons comparé, in vitro, le pouvoir ostéogénique des extraits ESM des deux espèces *P. radiata* et *P. margaritifera* sur deux types de cellules les préchondrocytes ATDC5 et les préostéoblastes murins MC3T3.

Les différents extraits (Ln, Lc, Br et Bm) induisent l'engagement des cellules MC3T3 vers le lignage ostéoblastique par l'activation des promoteurs des gènes spécifiques du tissu osseux, tels que: le collagène de type 1, l'ostéocalcine (OC), l'ostéopontine(OP) et le Runx2. Ces extraits induisent aussi l'engagement des cellules ATDC5 vers la différenciation endochondrale par l'activation des promoteurs des gènes spécifiques du tissu osseux, tels que: le collagène de type 1 alpha-1 (Col1a1), l'Aggrécane et le collagène de type X alpha-1 (ColXA1). De plus, nous remarquons que la fraction organique ou ESMr(Br) en comparaison avec celle de *P. margaritifera* (Bm) présente également les propriétés stimulantes de la nacre et la stimulation est même beaucoup plus importante.

Ces résultats mettent en évidence, dans les modèles expérimentaux mis en oeuvre, l'intérêt des lipides. Ces derniers semblent jouer un rôle important dans cette stimulation.

De plus, nous pouvons penser à la possibilité de l'association des molécules de nacre ou de biominéralisation avec les acides gras de la nacre et de la chair dans les défauts osseux à travers les sites actifs de l'os ou du cartilage humain présentant les différentes pathologies ostéoarticulaires.

Mots Clés : *Pinctada radiata*, la nacre, la chair, les variations saisonnières, PhosphatidylCholine (PC), Phosphatidyléthanolamine(PE), Phosphatidylsérine (PS), Phosphatidylinositol (PI), les acides gras polyinsaturés, (n-3) et (n-6), l'ESM (Ethanol soluble Matrix), ATDC5, MC3T3, les gènes du tissu osseux.

Summary

The nacre layer of the shell of the pearl oyster *Pinctada radiata* of Tunisian coast is considered a promising osteogenic biomaterial. The objective of this work entitled "Osteogenic, integration and quality of nacre of a tunisian coast bivalve: *Pinctada radiata* (Leach, 1814)" is a first step to enhance the species *P.radiata* its nutritional quality by seasonal monitoring of the composition of the flesh of total lipids and phospholipids in particular PC, PE, PS and PI. The analyzes showed that lipids of *P.radiata* are characterized by rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the n-3 more than 3 times that of PUFAs n-6 series. These PUFAs of the n-3 series particularly EPA (C20: 5n-3) and DHA (C22: 6n-3) are known to be the most important AG in the food as prevent of the cardiovascular disease, and joint/ bone pathologies. Moreover, *P. radiata* of Mahares region has the best quality of nacre in Tunisia. Biochemical analyzes showed that this region is the best location of this species that is far from the port areas and different sources of stress (fishing, exploitation, tourist area etc ...). In addition to this aspect, the area contains pintadines having good quality in terms of thickness of nacre.

Our results show that the seasonal composition of fatty acid of phospholipids in particular glycerophospholipids (PE, PI, PS and PC) nacre is rich in saturated fatty acids C14: 0, C16: 0 and C18: 0 especially in winter and spring in a lesser degree. Nacre, osteogenic substance, was also characterized by a high rate of PUFA of the n-3 and n-6 rate, especially (18: 3n-3, 18: 4n-3, 20: 5n-3, 22 5n-3, 22: 6n-3 and 20: 4n-6).

To demonstrate the osteogenic potential of extracts of nacre, we have established an "*in vitro*" model using 4 lipid extracts: the lipid extract of nacre *P.radiata* (Ln); the lipid extract of the flesh of *P.radiata* (Lc), ESM (Ethanol soluble Matrix) of the mother-of *P.radiata* (Br) and ESM nacre of *P. margaritifera* (Bm). We compared "*in vitro*" osteogenic power ESM extracts of both species *P. radiata* and *P. margaritifera* on two types of cells the préchondrocytes ATDC5 and the murine preosteoblasts MC3T3.

The different extracts (Ln, Lc, Br and Bm) induce engagement MC3T3 osteoblast lineage cells to the activation of the promoters of specific genes of bone tissue, such as collagen type 1, osteocalcin (OC), osteopontin (OP) and Runx2. These extracts also induce the commitment of ATDC5 cells to endochondral differentiation by activating specific genes promoters of bone tissue, such as collagen type 1 alpha 1 (COL1A1), the aggrecan and collagen type alpha 1-X (ColXA1). Moreover, we note that the organic fraction or ESMR (Br) compared with that of *P. margaritifera* (Bm) also has stimulant properties of nacre and the stimulation is even more important.

These results demonstrate, in experimental models used, the interest of lipids. They seem to play an important role in this stimulation. Moreover, we can think about the possibility of the association of molecules or nacre biomineralization with the fatty acids of the nacre and flesh in bone defects through the active sites of bone or cartilage presenting the human osteoarticular different pathologies.

Keywords: *Pinctada radiata*, mother of pearl, flesh, seasonal variations, phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), polyunsaturated fatty acids, (n-3) and (n-6), ESM (Ethanol soluble Matrix), ATDC5, MC3T3, genes of bone tissue.

NOMS USUELS ET TRIVIAUX DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS PRESENTES DANS CETTE THESE

Acide gras	Nomenclature (acide)	Noms triviaux (acide) ou abréviations
C14:0	tétradécanoïque	myristique
C15:0	pentadécanoïque	-
C16:0	hexadécanoïque	palmitique
C17:0	heptadécanoïque	margarique
C18:0	octadécanoïque	stéarique
C22:0	docosanoïque	béhénique
C14:1	cis-9 tétradécanoïque	myristoléique
C15:1	-	-
C16:1	cis-9 hexadécénoïque	palmitoléique
C18:1n-9	cis-9 octadécénoïque	oléique
C18:1n-7	cis-11 octadécénoïque	vaccénique
C20:1n-9	cis-11 eicosénoïque	gadoléique
C22:1	cis-13 docosénoïque	erucique
C18:2n-6	cis-9,12 octadécadiénoïque	cis-9,12 octadécadiénoïque
C20:2n-6	cis-11,14 eicosadiénoïque	-
C20:4n-6	cis-5,8,11,14 eicosatétradiénoïque	Arachidonique (AA)
C18:3n-3	cis 9,12,15 octadécatriénoïque	linoléinique
C18:4n-3	cis-6,9,12,15 octadécatétraénoïque	stéaridonique
C20:4n-3	cis-6,9,11,14 eicosatétraénoïque	-
C20:5n-3	cis-5,8,11,14,17 eicosapentaénoïque	EPA
C22:3n-3	cis-13,16,19 docosatriénoïque	-

C22:5n-3	cis-7,10,13,16,19 docosapentaènoïque	-
C22:6n-3	cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaènoïque	DHA
C16:2n-4	-	-
C16:3n-4	-	-
C18:3n-4	-	-
C22:2i	-	-
C22:2j	-	-

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Arachidonique (20:4n-6)	PGE2 : Prostaglandine E2
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (actuellement ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail)	PGI2 : Prostacycline I2
AG : Acide Gras	PLA2 : Phospholipase A2
AGMI : Acide Gras Monoinsaturé	PPAR : récepteur au proliférateur de peroxyosome
AGPI : Acide Gras Polyinsaturé	PS: Phosphatidylsérine
AGS : Acide Gras Saturé	SVF: Sérum de Veau Foetal
AGT : Acides gras totaux	TXA2: Thromboxane A2
ALA : Acide α -Linoléique (18:3n-3)	CAEP: céramide aminoéthylphosphonate
ANC : Apports Nutritionnels Conseillés	CL: cardiolipide
DGLA : Acide dihomogamma-linoléique (20:3n-6)	CPG: chromatographie en phase gazeuse
DHA: Acide Docosahexaénoïque (22:6n-3)	FA: fatty acid
DPA n-6 ou n-3 : Acide Docosapentaénoïque de la série n-6 (22:5n-6) ou de la série n-3 (22:5n-3)	GPL: glycérophospholipide
DO : Densité Optique	MUFA: monounsaturated fatty acid
EPA : Acide Eicosapentaénoïque (20:5 n-3)	NMI: non-methylene-interrupted
LA : Acide Linoléique (18:2 n-6)	Plsm: plasmalogène
MEM : Milieu Essentiel Minimum de Eagle	PI: Phosphatidylinositol
PBS: Phosphate Buffered Saline	PL: phospholipide
PC: PhosphatidylCholine	PS: Phosphatidylsérine
PE: Phosphatidyléthanolamine	PUFA: polyunsaturated fatty acid
PF: poids frais	SFA: saturated fatty acid

Table des Matières

Introduction générale	1
Partie I : Revue Bibliographique	6
I. Les Biomatériaux	7
I. 1. Du biomatériau de comblement osseux à l'ingénierie tissulaire osseuse.....	11
I. 2. Les biomatériaux d'origine marine.....	13
I. 3. La nacre	14
I3. 1. Structure de la nacre.....	15
I3. 2. Genèse de la nacre :	16
I3. 3. Intérêt économique.....	20
I3. 4. Les propriétés biologiques de la nacre.....	21
I3. 4.1. Etudes in vivo.....	21
I3. 4.2. Etudes in vitro	22
I3. 5. Formation des os	23
I3. 5. a. Remodelage osseux	24
I3. 5. b. Ostéointégration	25
I3.6.Utilisations dans le domaine médical en tant que substitut osseux : Les Potentialités ostéogènes de la Nacre	27
II. L'os	30
II. 1. La matrice extracellulaire osseuse.....	31
II. 2. Les différents types de tissu osseux	32
II. 2. 1. L'os cortical.....	33
II. 2. 2. L'os trabéculaire	34
II.3. Les cellules du métabolisme osseux.....	35
II.3.1. Les ostéoblastes	35
II.3.1.a. Ostéoblaste et matrice	35
II.3.1.b. La synthèse de la matrice extracellulaire	37

II.3.1.c. La minéralisation.....	38
II.3.2. Les ostéocytes.....	38
II.3.3. Les ostéoclastes.....	39
II. 4. La réparation physiologique du tissu osseux.....	40
II. 4.1. Les chondrocytes, cellules du modelage.....	40
II. 4. 2. L'ossification enchondrale.....	41
II. 4. 3. L'ossification intra-membranaire.....	42
II. 4. 4. La réparation osseuse primaire ou de contact direct.....	43
II. 5. Le cycle du remodelage osseux.....	43
II. 6. L'articulation et le cartilage.....	44
II. 7. Les pathologies de l'os et du cartilage.....	46
II.8. Modélisation <i>in vitro</i> des étapes de la différenciation osseuse.....	50
II.8. 1. Choix des cellules.....	50
II.8. 2. Les pré-ostéoblastes.....	50
II.8. 2. 1. Les marqueurs de la différenciation ostéoblastique.....	51
II.8. 2. 2. Collagène de type I.....	53
II.8. 2. 3. Ostéocalcine.....	53
II.8. 2. 4. Ostéopontine.....	54
II.8.2.6. Runx2 dans l'ostéogenèse et la chondrogenèse.....	56
II.8. 3. Les chondrocytes.....	57
II.8. 3.1. La différenciation chondrocytaire et ses marqueurs au cours de l'ossification endochondrale.....	57
II.8. 3.2. L'hypertrophie des chondrocytes.....	58
II.8. 3.3. Les marqueurs de la différenciation chondrocytaire.....	59
II.8. 3.1. Collagène de type I.....	59
II.8. 3.2. Collagène de type X.....	60
II. 9. Composition du tissu osseux en lipides.....	61

II. 10. Lipides et tissu osseux	62
III. Les lipides.....	62
III.1 Définition	62
III.2 les lipides membranaires contre les Lipides de reserve	63
III.3 lipides membranaires et membranes cellulaires	65
III.4 Structure des lipides membranaires	66
III.4.1 Acides gras	66
III.4.2 Classes de phospholipides.....	70
III.4.3 Sous-classes de glycérophospholipides.....	72
III.5 Compositions lipidiques membranaires.....	74
III.5.1 composition en classes de phospholipides	74
III.5.2 Composition en sous-classes de glycerophospholipides.....	75
III.6 Biosynthese des lipides membranaires	76
III.6 .1 Biosynthèse des acides gras	76
III.6 .2 Biosynthese des acides gras chez les bivalves	77
III.6 .3 Acides gras particuliers biosynthetyses chez les bivalves	79
III.6 .4. Biosynthèse des phospholipides.....	79
III.6 .4.1. Biosynthèse des diacylglycerophospholipides	79
III. 7. Rôles biologiques et thérapeutiques des acides gras.....	82
III. 8. Les activités biologiques des lipides.....	84
III. 8. 1. Activité antibiotique.....	84
III. 8. 2. Cytotoxicité et activité antiproliférative.....	85
III. 9. Qualité nutritionnelle des Mollusques bivalves.....	86
III. 10. Variation saisonnière de la composition biochimique des mollusques	88

Partie II: Contexte scientifique, présentation du matériel biologique et methodes	90
A.Présentation du matériel biologique	91
I. Présentation de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i>	91
I.1. Taxonomie: Position systématique	91
I.2. Noms vernaculaires	93
I.3. Morphologie et caractère distinctif	94
I. 4. Anatomie	94
I.5. Répartition géographique et bathymétrie	97
I.5. 1. Répartition géographique	97
I.5. 1. a. Dans le monde	97
I.5. 1. b. En Méditerranée	98
I.5. 1. c. En Tunisie	99
I.5. 1. d. Répartition bathymétrique et habitat	99
I.5. 1. e. Intérêt écologique	100
II. Présentation de la nacre de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i>	100
III. Produits chimiques et réactifs	101
III. 1. Kits	102
III. 2. Matériels	102
IV. <i>Pinctada margaritifera</i>	103
IV. 1. La nacre de <i>Pinctada margaritifera</i>	104
V. Les cellules étudiées	105
V. 1. Les ATDC5	105
V.2. Les MC3T3	105
VI. Les inducteurs	106
VI. 1. Le β -glycérophosphate (β GP)	106
VI. 2. L'acide ascorbique (AA)	106

B. Méthodes utilisés	107
I. Echantillonnage et suivi saisonnier	107
I.1. Situation géographique	107
I.2. Echantillonnage	108
II. Qualité de la nacre	109
III. Etude morphologique de la coquille	109
III.1. Etude biométrique	112
III.2. Mesure de l'épaisseur de la couche de nacre	116
VI. Préparation de la poudre de nacre	118
IV.1. Tamisage et conditionnement de la poudre de nacre	119
IV.2. Estimation du rendement en poudre de nacre	119
IV.3. Traitement statistique des données	120
IV.3.1. La variance	120
IV.3.2. L'écart type	121
V. Analyses effectuées	121
V.1. Extraction des lipides totaux	121
V.2. Analyse des acides gras	124
V.2.a. Obtention des esters méthyliques d'acides gras	124
V.2.b. Séparation des esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse	124
V.3. Dosage des protéines totales	126
V.4. Teneur en eau	126
V.5. Extraction des molécules de nacre (ESM)	126
V.6. Extraction des lipides totaux de la nacre et de la chair	127
VI. La culture cellulaire	128
VI.1. Milieux de culture utilisés pour les deux types de cellules	128
VI.2. Entretien des cellules	129
VI.2.1. Ensemencement en micromasse des plaques 12 puits des cellules ATDC5	129

VI.2.2. Conditions de culture	130
VI.2.3. Traitement des cellules ATDC5	130
VI.2.4. Arrêt des traitements	132
VI.2.5. Ensemencement en monocouche des plaques de 24 puits des cellules MC3T3	132
VI.2. 6. Traitement des cellules MC3T3	133
VI.2.7. Arrêt des traitements	134
VI.2. 8. Etude de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire	135
VI.2. 8. a. Test MTT.....	135
VI.2. 8. b. Test LDH.....	136
VII. Histologie.....	137
VII.1. Coloration Bleu Alcian	137
VII. 2. Coloration rouge Alizarine.....	137
VII. 3. Coloration rouge Sirius	138
VIII. Biologie Moléculaire.....	138
VIII. 1. Extraction des ARN totaux avec le kit <i>RNeasy Plus</i> (QIAGEN).....	138
VIII. 2. Dosage des ARN au NANODROP.....	139
VIII. 3. Transcriptase inverse (RT)	139
VIII. 4. Polymérase Chaîne Réaction (PCR) en temps réel.....	140
IX. Méthodes d'analyse statistique	143
IX. 1. Expression et interprétation statistique des résultats	143
IX. 1.1. Anova et Manova.....	143
IX. 1.2. Analyse en Composantes Principales (ACP).....	144
Partie III : Résultats et discussions	146
Introduction	147
Chapitre I : Variations saisonnières de la composition biochimique de la chair de <i>Pinctada radiata</i> dans la zone de Maharès	151
A.Variations saisonnières de la composition biochimique de la chair de <i>Pinctada radiata</i> dans la zone de Maharès	152

A.I.Variations saisonnières de la teneur en eau chez <i>Pinctada radiata</i>	152
A.II.Variations saisonnières de la teneur en protéines totales chez <i>Pinctada radiata</i>	153
A.III.Variations saisonnières de la composition en acides gras totaux chez <i>P. radiata</i> :	
Importance des lipides et apports nutritionnel.....	154
A.III. 1. Analyse des résultats	154
A.III. 2. L'analyse en composante principale (ACP).....	155
A.IV.Variations saisonnières de la composition en acides gras des catégories lipidiques essentiels de la chair de <i>P.radiata</i>	158
A.IV.1. Variations saisonnières de la composition en acides gras des phosphatidylcholines (PC) de la chair de <i>P.radiata</i>	158
A.IV.1. a. Analyse des résultats	158
A.IV.1. b. L'analyse en composante principale (ACP)	158
A. IV. 2. Variations saisonnières de la composition en acides gras des phosphatidyléthanolamines (PE) de la chair de <i>P.radiata</i>	162
A.IV.2. a. Analyse des résultats	162
A.IV.2. b. L'analyse en composante principale (ACP)	162
A.IV. 3. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PI de la chair de <i>P.radiata</i>	165
A.IV. 4. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PS de la chair de <i>P.radiata</i>	167
B. Discussion	170
B.I. Variation saisonnière de la teneur en eau de la chair de <i>Pinctada radiata</i>	170
B.II. Variation saisonnière du taux en protéines de la chair de <i>Pinctada radiata</i>	170
B.III. Variation saisonnière des lipides totaux et des glycérophospholipides de la chair de <i>Pinctada radiata</i>	172
Chapitre II : Qualité et composition biochimique de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> au niveau de la région de Maharés	183
A. Introduction	184

B. Qualité et composition biochimique de la nacre de <i>P. radiata</i> au niveau de la région de Maharés	185
B. I. Variations saisonnières de la teneur en protéines totales de la nacre de <i>P. radiata</i>	185
B. II. Qualité de la nacre de <i>Pinctada radiata</i>	186
B. II. 1. Structure démographique de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i>	186
B. II. 2. Etude de l'épaisseur de la couche de nacre de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i> ..	187
B. III. Estimation du rendement en poudre de nacre.....	188
B. IV. Variations saisonnières de la composition en acides gras totaux de la nacre de <i>Pinctada radiata</i>	189
B. IV. 1. Analyse des résultats.....	189
B. IV. 2. L'analyse en composante principale (ACP).....	190
B. V. Variations saisonnières de la composition en acides gras des catégories lipidiques essentielles de la nacre de <i>P. radiata</i>	194
B. V.1. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PC de la nacre de <i>P. radiata</i>	194
B. V. 1. a. Analyse des résultats.....	194
B. V. 1. b. L'analyse en composante principale (ACP).....	194
B. V. 2. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PE de la chair de <i>P. radiata</i>	198
B. V. 2. a. Analyse des résultats.....	198
B. V. 2. b. L'analyse en composante principale (ACP).....	198
B. V.3. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PI de la nacre de <i>P. radiata</i>	202
B. V. 3. a. Analyse des résultats.....	202
B. V. 3. b. L'analyse en composante principale (ACP).....	202
B. V. 4. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PS de la nacre de <i>P. radiata</i>	206
B. V. 4. a. Analyse des résultats.....	206
B. V.4. b. L'analyse en composante principale (ACP).....	206

C. Discussion	210
C. I. Variations saisonnières de la teneur en protéines totales de la nacre de <i>P.radiata</i>	210
C.II. Qualité de la nacre.....	212
C. III. Variation saisonnière des lipides totaux et des glycérophospholipides de la nacre de <i>Pinctada radiata</i>	214
Chapitre III: Comparaison de la composition en lipides polaires de la nacre et de la chair de <i>Pinctada radiata</i> au niveau de la région de Maharès.....	
A. Introduction	
B. Variations saisonnières des lipides polaires de la nacre et de la chair de <i>P. radiata</i>	
B.I.Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de <i>Pinctada radiata</i>	225
B.I.1.Analyse des résultats.....	225
B.I.2. L'analyse en composante principale (ACP)	226
B.II.Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de <i>Pinctada radiata</i>	230
B.II.1. Analyse des résultats.....	230
B.II.2.L'analyse en composante principale (ACP)	230
C. Discussions	234
Chapitre IV: Activité des extraits de la nacre et de la chair sur la différenciation des ATDC5.....	
A. Introduction	239
B. Etude de cytotoxicité et viabilité	243
C. Activité des extraits sur les Pré-chondrocytes murins ATDC5	245
C.I. Histologie.....	245
C.II. Expression des gènes (q PCR)	250
D. Discussion et conclusion	254
Chapitre V : Activité des extraits de la nacre et de la chair sur la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3	
	259

A. Activité des extraits sur les pré-ostéoblastes MC3T3	260
A.I. Histologie	260
A. II. Expression des gènes (q PCR)	265
B. Discussion	267
Conclusions et perspectives	278
Références bibliographiques	284
Annexes	355

Liste des illustrations

Figure 1. Illustration de la formation osseuse au niveau d'un biomatériau implanté avec des cellules ostéogéniques d'après Muschler <i>et al.</i> , 2004.	10
Figure 2. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire.....	12
Figure 3. Structure en brique et mortier de la couche nacrée de l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> (Rousseau <i>et al.</i> , 2009).....	16
Figure 4. La coquille de l'huître <i>Pinctada margaritifera</i>	18
Figure 5. Valve droite contenant la perle de <i>Pinctada radiata</i>	20
Figure 6. Implantation d'un morceau de nacre au niveau d'un fémur de mouton.	22
Figure 7. Injection de poudre de nacre dans les vertèbres de mouton.....	23
Figure 8. Différenciation d'une cellule souche mésenchymateuse (Pittenger ; 1999).....	24
Figure 9. Place de l'ostéoblaste au cours du cycle de remodelage osseux.....	25
Figure 10. Remaniement osseux : phase de résorption et d'apposition	27
(Manuel d'implantologie clinique Edition CdP).....	27
Figure 11. Réaction autour d'un fragment de nacre posé dans une culture cellulaire d'ostéoblastes humains. Caractère Ostéogénique de la nacre (Lopez <i>et al.</i> , 1992).....	28
Figure 12. Ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire composée des deux phases : organique (PO) et minérale (PM). La barre d'échelle représente 2 µm (Choi <i>et al.</i> , 2002) ..	32
Figure 13 . Composition et structure d'un os long. Figure adaptée de Servier Medical Art et du Larousse médical.....	33
Figure 14. http://www.casimages.com/img.php?i=13011107180614676010750963.jpg	35
Figure 15. L'ostéoblaste produit la matrice ostéoïde puis la minéralise.....	39
Figure 16. Processus de l'ossification endochondrale (A) adapté de http://faculty.irsc.edu d'après Calmar <i>et al.</i> , 2002. Image histologique et représentation schématique de la plaque de croissance (B) adapté de http://www.bu.edu et Page-McCaw <i>et al.</i> , 2007.	42
Figure 17. Remodelage du tissu osseux, adaptée de Canalis <i>et al.</i> , 2007.	44
Figure 18 . Structure du cartilage articulaire sain	45

Figure 19. Relation couplée et réciproque entre la prolifération cellulaire et l'expression des gènes de la différenciation (Stein et Lian, 1993). Coll : collagène ; PAL : activité phosphatase alcaline ; OP : ostéopontine ; OC : ostéocalcine	52
Figure 20. Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques précoces	55
Figure 21. contrôle de la transcription des osteoblastes.....	56
Figure 22. Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale.....	58
Figure 23. Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires.....	64
Figure 24. Différents modes d'arrangement spontané de molécules lipidiques amphiphiles en environnement aqueux : liposome, micelle et bicouche ou feuillet (Cullis <i>et al.</i> , 1963).....	65
Figure 25. Eléments structuraux d'une membrane cellulaire (Yann, 2004).....	66
Figure 26. Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ».....	69
Figure 27. Structure des acides gras NMI chez les mollusques bivalves. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de chacune des doubles liaisons, comptée à partir de la fonction acide.....	69
Figure 28. Structure des acides gras branchés de forme « iso » et « anteiso »	70
Figure 29. Structure des principaux phospholipides	71
Figure 30. Structure des différentes sous-classes de la phosphatidyléthanolamine.....	73
Figure 31. Biosynthèse de l'acide palmitique 16:0 (Maier <i>et al.</i> , 2006).....	77
Figure 32. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Les chiffres entre [] indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide (Zhukova, 1991).....	78
Figure 33. Biosynthèse des AG NMI et du 20:1n-11 (Kraffe, 2003).....	79
Figure 34. Biosynthèse des phospholipides (Hatch & Choy, 2004).....	81

Figure 35. Principales fonctions exercées par les acides gras dans l'organisme humain (Guesnet <i>et al.</i> , 2005).....	88
Figure 36. Anatomie de <i>Pinctada radiata</i> (Gervis & Sims, 1992).....	96
Figure 37. Coquille ouverte montrant la chair de <i>Pinctada radiata</i>	96
Figure 38. Répartition géographique mondiale de <i>P.radiata</i>	97
Figure 39. Répartition de <i>Pinctada radiata</i> en Méditerranée (Zenetos <i>et al.</i> , 2003).....	98
Figure 40. Face interne de la coquille de <i>Pinctada radiata</i>	101
Figure 41. Face interne et externe de la coquille <i>Pinctada margaritifera</i>	103
Figure 42. Situation géographique du site d'échantillonnage de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i> : Maharès (■) au niveau du golfe de Gabès.....	107
Figure 43. Mesure des paramètres linéaires chez <i>Pinctada radiata</i> A : Mesure de la Hauteur (H); B : Mesure du renflement (R) ; C : Mesure de la ligne charnière (Lch)	109
Figure 44. Mesures des paramètres linéaires de la valve droite (A) et la valve gauche (B) de <i>Pinctada radiata</i>	111
Figure 45. Egouttement des échantillons sur un papier filtre.....	112
Figure 46. Traçage de l'axe de la coupe sur la valve gauche d'un spécimen de <i>P.radiata</i> ...	116
Figure 47. Opération de coupe	117
Figure 48. Mesure de l'épaisseur de la couche nacrée sous loupe binoculaire (G*63)	117
Figure 49. Morceaux de nacre obtenus après raclage	118
Figure 50. Opérations de broyage à l'aide d'un mortier	119
Figure 51. Opérations de broyage à l'aide broyeur Retsch RM100.....	119
Figure 52. Schéma montrant la séparation de différentes catégories lipidiques sur plaque de gel de silice. LP : Lipides polaires ; LN : Lipides neutres ; PC : Phosphatidylcholines ; PS : Phosphatidylsérine ; PI : Phosphatidylinositol ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; MDG : Mono-diacylglycérol ; AGL : Acides Gras Libres ; TAG : Triacylglycérol ; Chol : Cholestérol estérifié.....	123
Figure 53. Chromatogramme montrant les différents pics qui correspondent aux acides gras présents dans l'extrait lipidique analysé.....	125
Figure 54. Schéma d'extraction des molécules d'ESM	127

Figure 55. Modèle de plaque montrant les différents traitements sur les ATDC5.....	131
Figure 56. Modèle de plaque montrant les différents traitements sur les MC3T3.....	134
Figure 57. Variations saisonnières de la teneur en eau chez <i>P. radiata</i>	152
Figure 58. Variations des pourcentages moyens des protéines totales de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	153
Figure 59. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras totaux de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	156
Figure 60. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras totaux de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	157
Figure 61. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PC de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons	160
Figure 62. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PC de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons	161
Figure 63. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PE de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	163
Figure 64. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PE de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	164
Figure 65. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PI de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	166
Figure 66. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PS de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	168
Figure 67. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PS de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	169
Figure 68. Variations des teneurs (%) des acides gras totaux des différentes catégories lipidiques de la chair de <i>P. radiata</i> en fonction des saisons	178
Figure 69. Variations des teneurs (%) des EPA+DHA des différentes catégories lipidiques de la chair de <i>P. radiata</i> en fonction des saisons	181
Figure 70. Schéma montrant la disposition des différentes composantes lipidiques dans la membrane (Cooper, 2000).....	184

Figure 71. Variations des pourcentages moyens des lipides totales de la nacre de <i>P. radiata</i> en fonction des saisons.....	185
Figure 72. Histogramme de fréquences de tailles de l'huître perlière <i>Pinctada radiata</i> à Maharès.....	187
Figure 73. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des lipides totaux de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	192
Figure 74. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des lipides totaux de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	193
Figure 75. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PC de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	196
Figure 76. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PC de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	197
Figure 77. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PE de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	200
Figure 78. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PE de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	201
Figure 79. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PI de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	204
Figure 80. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PI de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	205
Figure 81. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PS de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	208
Figure 82. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PS de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	209
Figure 83. Variations des teneurs (%) des acides gras totaux des différentes catégories lipidiques de la nacre de <i>P. radiata</i> en fonction des saisons.....	220
Figure 84. Le modèle de la mosaïque fluide de la structure membranaire (Lehninger et al.,1994).....	221
Figure 85. La distribution des lipides de la membrane érythrocytaire entre les faces interne et externe (Lehninger et al.,1994).....	221

Figure 86. Variations des teneurs (%) des EPA+DHA des différentes catégories lipidiques de la nacre de <i>P. radiata</i> en fonction des saisons	222
Figure 87. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	228
Figure 88. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.....	229
Figure 89. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons.	232
Figure 90. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de <i>Pinctada radiata</i> en fonction des saisons. ...	233
Figure 91. Comportement nutritionnel de l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> (Robert et al ; 1995).....	236
Figure 92. (A) Proportion relative de quelques acides gras essentiels (AA, EPA et DHA) et acides gras polyinsaturés de la fraction des lipides polaires de la chair de <i>P. radiata</i>	238
(B) Proportion relative de quelques acides gras essentiels (AA, EPA et DHA) et acides gras polyinsaturés de la fraction des lipides polaires de la nacre de <i>P. radiata</i>	238
Figure 93. Métabolisation des AGPI par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes). Chaque famille de molécules comporte 3 séries selon la nature de l'AGPI précurseur. Ces molécules régulent des fonctions diverses : reproduction, coagulation sanguine, hémostase, inflammation... ..	240
Figure 94. Effet cytotoxique des lipides de la nacre (Ln) et de la chair (Lc) de L'ESMr et de l'ESMm sur les cellules MC3T3. Test de cytotoxicité, LDH (1) et test de viabilité cellulaire, MTT (2).....	243
Figure 95. Résultats des colorations (RA, BA et RS) menées sur les pré-chondrocytes murins ATDC5 cultivés en micromasse avec les différents extraits Ln, Lc, Br et Bm à une concentration de 100µg/ml à J7, J10 et J14. La position des différents extraits est indiquée. (par colonne) (n=1). (manip1).....	247
Figure 96. Effets des lipides Ln et Lc et ESMr et ESMm sur l'expression des différents gènes impliqués dans la chondrogénèse (col I, col II, Agrécan et col X) sur les cellules de la lignée	

ATDC5 cultivée en micromasse sur une cinétique de 14 jours avec des temps d'arrêt à J1, J7, J10 et J14. NADPH a été utilisé comme gène de ménage. Les calculs de « fold » sont réalisés avec les valeurs du contrôle à J1.....	251
Figure 97. Effets des différents extraits lipidiques de la nacre (Ln)et de la chair (Lc), de L'ESMr et de l'ESMm sur la capacité de minéralisation des cellules MC3T3 après 14 jours de traitement. Coloration Rouge Alizarine. La position des différents extraits est indiquée par colonne. (n=3).	262
Figure 98. Dosage de la Coloration Rouge Alizarine sur des différents extraits lipidiques de la nacre (Ln)et de la chair (Lc), de L'ESMr et de l'ESMm sur la capacité de minéralisation des cellules MC3T3 après 14 jours de traitement. Analyse statistique : T-test ($P < 0,05^*$; $P < 0,0005^{**}$). La position des différents extraits est indiquée. (par colonne) (n=3).	264
Figure 99. Effets des lipides sur l'expression génique des Ostéocalcine, Ostéopontine, Col I et Runx2 des MC3T3 traités durant 14 jours. RP29 a été utilisé comme gène de ménage. Les calculs de « fold » sont réalisés avec les valeurs du contrôle à J1.	266

Liste des tableaux

Tableau I. Comparaison des constitutions des trois cartilages.....	46
Table II. Composition relative des phospholipides de mollusques. Extrait de Vaskovsky (1989).....	75
Table III. Localité et données biologiques de l'huître perlière <i>P. radiata</i> à Maharès. Resultats exprimés en moyenne \pm SE ($n=6$)	108
Tableau IV. Composition du milieu de culture des cellules ATDC5	128
Tableau V. Composition du milieu de culture des cellules MC3T3	128
Tableau VI. différents traitements sur cellules ATDC5	131
Tableau VII. Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour les ATDC5..	142
Tableau VIII. Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour lesMC3T3 .	143
Tableau IX. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (AGT)	155
Tableau X. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (PC)	159
Tableau XI. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (PE).....	162
Tableau XII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (PI).....	165
Tableau XIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (PS).....	167
Tableau XIV. Composition en acides gras totaux et phospholipides majeurs dans la chair de <i>Pinctada radiata</i> . a,b,c – valeurs dans les lignes ayant des indices de lettre différent de façon significative, $P \leq 0.05$	173
Tableau XV. Epaisseur moyenne de la nacre dans les différents sites d'études.....	188
Tableau XVI. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (AGT).....	191

Tableau XVII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (PC).....	195
Tableau XVIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (PE).....	199
Tableau XIX. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (PI).....	203
Tableau XX. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (PS).....	207
Tableau XXI. les protéines partiellement caractérisées, associées aux coquilles de mollusques	211
Tableau XXII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Chair (LP).....	227
Tableau XXIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels Nacre (LP).....	231

Introduction générale

La surface de notre planète est recouverte à 71% par des océans. Lesquels sont riches d'une biodiversité estimée entre 3 et 500.106 espèces marines (Haug *et al.*, 2002b). A elle seule, la macrofaune marine comprend entre 0,5 et 10.106 espèces (De Vries & Hall, 1994). Avec plus de 100 000 espèces, le phylum des mollusques est le 2ème en importance après celui des arthropodes. Plus 50 000 espèces de mollusques marins ont été décrites à ce jour (Kornprobst, 2005). Cette biodiversité océanique dépend principalement des interactions avec l'environnement et intra- et inter-espèces. Le potentiel du milieu marin, comme ressource exploitable en biotechnologie, reste encore insuffisamment exploré.

Les organismes marins présentent donc un intérêt scientifique énorme. Les huîtres constituent l'un des principaux groupes d'espèces d'aquaculture dans le monde mise à part leur production ostréicole, leur richesse, notamment, en acides gras polyinsaturés (oméga 3 et oméga 6). Ces derniers participent à des processus importants comme la constitution et l'intégrité des membranes cellulaires, le fonctionnement du système cardiovasculaire, du cerveau, du système hormonal ainsi que la régulation du système inflammatoires. Ainsi, de par leur nature et leur abondance dans l'alimentation, les AGPI sont susceptibles d'influer la prévention ou la survenue d'un grand nombre de pathologies (Astorg *et al.*, 2006 ; Calder et Yaqoob, 2009). Ainsi la quantité et la qualité des lipides présents dans les organismes marins comme les huîtres sont contrôlés par différents facteurs biologiques tels que la croissance, la reproduction ou la capacité des espèces à métaboliser ce type de composés. Elles dépendent également de nombreux facteurs environnementaux (température, qualité des eaux, hydrologie ...) qui déterminent entre autres choses, la nature et la disponibilité de la nourriture présente dans le milieu. En effet, les huîtres possèdent des structures, des voies métaboliques, des systèmes reproducteurs et des mécanismes de perception et de défense uniques parce qu'ils ont su s'adapter à leur environnement, parfois hostile. L'identification de nouvelles substances naturelles marines bioactives est une voie prometteuse pour identifier des stratégies thérapeutiques innovantes.

Dans ce contexte, les mollusques marins comme les huîtres perlières représentent d'une part, une source d'acides gras polyinsaturés (en particulier omega3 et omega 6) et d'autre part, une source de bien fait pour l'être humain se présentant dans leur couche nacrée interne. La nacre est un biomatériau fascinant qui fait l'objet d'une grande quantité de travaux de recherche dans des disciplines très diverses. C'est une microstructure très ancienne qui est apparue dès le Cambrien dans les coquilles des mollusques. Elle est potentiellement

importante par son pouvoir ostéogénique (Silve *et al.*, 1992 ; Lopez *et al.*, 1992 Atlan *et al.*, 1997 ; 1999 ; Lamghari *et al.*, 1999) pouvant servir de support pour la découverte de molécules bioactives à travers ses extraits, et ainsi contribuer au développement de nouvelles stratégies pour des actions préventives.

A une biodiversité marine considérable correspond une vaste chimiodiversité. Les composés décrits appartiennent généralement aux classes chimiques des dérivés d'acides gras (Ojika *et al.*, 1990), des stérols (Gerwick, 1993) et des composés mixtes (Maktoob & Ronald, 1997).

L'affinité qui existe entre la nacre et l'os pourrait être alors due à la présence dans la nacre d'une composante organique qui joue une fonction similaire à celle de la matrice organique osseuse de l'os (Kikuchi M *et al.*, 2004). Or, les lipides représentent l'un des principaux composés de l'os des vertébrés sachant que la littérature a largement lié l'apport lipidique et les pathologies ostéo articulaires. De nombreuses études ont rapporté un effet potentiellement bénéfique des AGPI sur la prévention des cancers, ainsi que dans différentes pathologies caractérisées par une réponse inflammatoire dont les pathologies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, le lupus, les pathologies respiratoires, le psoriasis, (Horrocks & Yeo, 1999 ; Stillwell & Wassall, 2003). L'impact des AGPI sur ces pathologies s'explique en partie par le fait que certains d'entre eux sont capables de générer des familles de molécules bioactives impliquées dans la mise en place et/ou la régulation du processus inflammatoire (Hong *et al.*, 2003, Serhan *et al.*, 2004). Ces AGPI en particulier de la série n-3 sont pressentis pour protéger le capital osseux (Ono *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2009; Corwin, 2003; Calder, 2006). Néanmoins, ce débat reste controversé et les mécanismes d'action sont mal connus.

L'os est un tissu qui possède la particularité de pouvoir se régénérer. Cette capacité a conduit l'homme à élaborer toutes sortes de techniques afin de pallier à diverses affections d'origine pathologique ou traumatique. Dans ce contexte et dans le but d'évaluer le pouvoir ostéogénique des extraits de la nacre d'un mollusque bivalve *P.radiata* des côtes tunisiennes. Des études réalisées par Lahmeri (2007) montrent le pouvoir ostéogénique de la nacre de l'huître perlière *P. radiata*. Cette étude a en fait conduit vers deux essais de comblement de perte de substance osseuse par la nacre en poudre dans le tibia du chien dans un premier temps et dans celle du lapin dans un second temps. Ce qui suggère que la nacre de *P. radiata* est prédisposée à être exploitée en tant que biomatériau de substitution et de régénération osseuse.

La recherche scientifique médicale pourrait encore ouvrir de nouvelles voies pour l'utilisation diverses de la nacre, et du fait de cette demande, contribuer à l'effort de production de nacre à usage médical. Il serait nécessaire alors d'améliorer la maîtrise de sa qualité et les rendements tout au long des côtes tunisiennes et d'étudier la composition saisonnière en acides gras totaux et en phospholipides de la nacre de l'huître perlière *P. radiata*, avec en complément l'étude du pouvoir ostéogénique des lipides extraits de la nacre.

L'huître perlière *Pinctada radiata* (Leach, 1814) est une espèce benthique sessile d'origine indo-Pacifique. En Tunisie, une seule étude sur la reproduction biologique de cette espèce récoltée autour des îles de Kerkennah a été réalisée jusqu'à aujourd'hui (Tlig -Zouari, 2009). En Tunisie, *P. radiata* n'a pas été beaucoup exploitée; sa consommation est limitée aux îles de Kerkennah et Djerba. En outre, *P. radiata* ne produit pas de perles et même quand elles sont présentes, elles sont de mauvaise qualité et très friable (Seurat, 1929). Cette espèce est abondante dans le golfe de Gabès en particulier à Maharès, mais sa répartition devient rare et même sporadique au niveau du golfe de Tunis (Tlig-Zouari, 2009 ; Ben Ammar, 2014).

Dans le but d'évaluer la qualité nutritionnelle de ce mollusque bivalve, nous nous sommes intéressés tout d'abord à suivre l'évolution au cours des saisons de la composition biochimique de sa chair en particulier les acides gras totaux et ceux des phospholipides.

En effet, les informations concernant la composition biochimique de sa chair au cours des saisons sont très peu présentes et non détaillées dans la littérature internationale et absentes à propos de sa nacre. Dans le but d'évaluer le pouvoir ostéogénique des lipides de la nacre, une comparaison avec ceux de la chair ainsi que son ESM (Ethanol Soluble Matrix) a été réalisée ainsi qu'une comparaison avec l'ESM d'une autre espèce de la famille des pinctadines : *Pinctada margaritifera*.

Cette étude est la première à avoir évalué les effets des lipides totaux de la nacre et de la chair de l'huître perlière *P. radiata* sur la minéralisation de 2 types de cellules cartilagineuses et osseuses. Dans ce contexte, les objectifs de notre travail sont multiples. Il s'agit tout d'abord de comprendre et étudier la composition en acides gras de la nacre et de la chair de l'huître perlière *P. radiata*.

Cette étude du pouvoir ostéogénique des lipides extraits de la nacre et de la chair se fera sur des cellules préostéoblastiques de souris MC3T3 et des cellules préchondrogéniques ATDC5 en culture *in vitro*. Nous étudierons l'effet de ces lipides sur la prolifération et la

différenciation cellulaire, à l'aide de dosages biochimiques et du suivi de l'expression génique des marqueurs de la différenciation cellulaire conduisant à la minéralisation.

Pour atteindre ces objectifs, nous nous intéresserons tout d'abord dans un premier chapitre à une synthèse bibliographique. Cette synthèse présentera les intérêts de l'ostéogénie de la nacre, un aperçu sur l'os et ses maladies. Nous recenserons ensuite l'importance des lipides dans les tissus osseux et les lipides particuliers comme les lipides polaires ou phospholipides.

Le deuxième chapitre visera la mise en forme du matériel et des différentes méthodes utilisées (échantillonnage saisonnier, la préparation de la poudre de nacre et l'extraction des lipides totaux, polaires ainsi que les catégories lipidiques, l'extraction des composés de la nacre : Extraction ESM (Ethanol Soluble Matrix).

Le troisième chapitre concernera les résultats et les discussions en trois parties avec une attention particulière qui sera portée à l'étude de la qualité de la nacre et à l'étude de la composition biochimique en particulier en acides gras totaux de la nacre et de la chair ainsi que les catégories lipidiques et une comparaison de leurs lipides polaires.

Deux chapitres termineront cette étude: un portera sur l'étude des effets des lipides de la nacre et de la chair et des extraits de nacre sur les cellules MC3T3 et le suivant sur les cellules ATDC5.

Enfin, nous terminerons par une conclusion permettant de dresser le bilan et de présenter les perspectives ouvertes par l'ensemble du travail présenté ici.

Partie I

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

I. Les Biomatériaux

En 1986, la Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux a retenu la définition suivante des biomatériaux : "**matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques**".

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes de blessures ou de brûlures. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Les biomatériaux recouvrent une grande variété d'applications biomédicales puisqu'ils peuvent être à la fois des matériaux de réparation des lésions tissulaires, des matériaux implantables et être constitutifs de systèmes d'assistance extracorporelle. Ils ne se définissent donc pas par une nature particulière mais par l'usage auquel on les destine : ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (collagène et cellulose), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique (Violaine, 2000).

Les Biomatériaux sont des matières ayant de nouvelles propriétés qui les rendent surtout approprié au contact avec un tissu vivant, ils sont produits à travers des processus souvent employés comme des phénomènes biologiques imitateurs. Vu l'amélioration de la qualité de vie, les biomatériaux sont le centre des efforts majeurs de la recherche médicale. Le progrès dans ce domaine exige une approche multidisciplinaire, où les scientifiques (pharmaciens, physiciens, mathématiciens, biologistes et docteurs médicaux), doivent travailler avec les ingénieurs, les producteurs de la matière et les fabricants.

Les biomatériaux peuvent être inorganiques, organiques, naturels ou synthétiques. Puisqu'ils sont placés dans le corps humain, ils doivent être biocompatibles, bio-résorbables (sutures solubles, os et cartilage) et bio-durables (implants orthopédique, greffes de l'os) afin d'éviter les inflammations et les rejets (Larsson, 2007). La notion de biocompatibilité est essentielle, cette biocompatibilité « Elargie » débouche sur la notion très actuelle de « bioactive » c'est-à-dire que le matériau fasse réagir le tissu vivant (Sedel et Janot, 2001). De par ses caractéristiques intrinsèques ou l'action de facteurs extrinsèques, un biomatériau doit promouvoir l'attachement, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires (Baquey et Bordenave, 2002).

Les biomatériaux destinés à la réparation osseuse doivent être capables d'assurer un support structural et mécanique aux cellules « réparatrices » qui vont le coloniser, permettre leur prolifération et la synthèse d'une matrice osseuse minéralisée. Ils doivent répondre à un cahier des charges précis prenant en compte les caractéristiques biologiques du tissu osseux (Sundelacruz et Kaplan, 2009).

Les substituts osseux font partie des biomatériaux et à ce titre jouissent actuellement d'un intérêt croissant. En effet, ils occupent sur le plan économique un important créneau de recherche et ils représentent une alternative aux greffes autologues qui sont mal acceptées vu les contraintes d'un prélèvement désuet.

Quatre grandes classes de biomatériaux peuvent être envisagées (Sedel et Janot, 2001):

- Les métaux et alliages métalliques,
- Les céramiques au sens large,
- Les polymères et la matière "molle",
- Les matériaux d'origine naturelle

Les biomatériaux de comblement osseux peuvent être des céramiques phosphocalciques, bioverres, corail.... Ces substituts, comme les précédents doivent être parfaitement tolérés par l'organisme hôte. Dans les zones sous charges, ils doivent répondre à des critères mécaniques afin de permettre au squelette de continuer à jouer son rôle de charpente. Les matériaux de comblement osseux sont en contact intime avec des tissus calcifiés qui se régénèrent spontanément. Ces matériaux devront être aptes à présenter des liaisons avec l'os environnant et favoriser sa croissance. A terme, l'idéal serait qu'il disparaisse en étant remplacé par de l'os.

L'os est le meilleur substitut de comblement osseux. Il est le seul à présenter des propriétés d'ostéoinduction, d'ostéointégration, d'ostéogénèse et d'ostéonconduction. Cependant la quantité disponible d'os est très limitée et les matériaux de substitution osseuse présentent une alternative intéressante aux greffes osseuses.

Le matériau peut être **ostéoconducteur** : ces matériaux sont envahis par l'ensemble des cellules générant la croissance de tissus. Cette invasion s'effectue par les pores des matériaux. Ce phénomène est tridimensionnel et conduit à la production d'une matrice osseuse comblant les porosités de l'implant (Charles et Cornell; 1999).

Le matériau peut être **ostéoinducteur** : ces matériaux sont capables de générer la différenciation et la croissance de cellules osseuses en site extra-osseux (Eid K *et al.* , 2001). De nombreuses recherches tentent de développer ce type de matériaux en associant des facteurs de croissance tels que les B M P (Bone Morphogenetic Proteins) au biomatériau (Eid K *et al.* , 2001 et Petite H ; 2002).

Le matériau peut être **biorésorbable** : Les biomatériaux placés dans l'organisme sont altérés suite à des activités enzymatique, cellulaire, bactérienne, virale. Leur disparition s'effectue au profit d'un remplacement à terme par les tissus osseux dont ils favorisent la croissance par ostéoconduction ou ostéoinduction. La biorésorption implique une biodégradation du matériau (perte des propriétés physiques du matériau par phagocytose par les macrophages et résorption par les cellules ostéoclastiques) et une biodissolution (perte des propriétés chimiques). Les produits de dégradation du matériau sont évacués par voie rénale ou métabolisée (Mainard *et al.*, 2001 ; Loty *et al.*, 1998). Ces réactions dépendent des critères physico-chimiques des implants (porosité, état de surface, cristallinité, composition). L'attachement et la propagation des cellules est soit une caractéristique nécessaire de biomatériaux ou qu'il doit être supprimé pour la performance souhaitée de l'implant Matériaux (Stamm ; 2008). Le cahier des charges du matériau support est encore sujet à débats. Idéalement le matériau support doit être :

- **Résorbable** afin de permettre son remplacement progressif par un tissu osseux néoformé. Sa résorption devrait être concomitante à la formation osseuse. En effet, trop rapidement résorbé, il ne pourrait pas servir de charpente sur laquelle les CSM vont déposer la matrice osseuse. Trop lentement résorbé, il empêcherait la formation osseuse en occupant un volume important au sein de la lésion.

- **Stérilisable**, sans perte de propriétés et sa fabrication doit être compatible avec une production de grade clinique à l'échelle industrielle.

Les biomatériaux sont poreux pour permettre la migration des cellules au centre du substitut, cependant, il est important qu'ils conservent une certaine résistance mécanique.

Ainsi, ils permettent l'accrochage des cellules et apportent une certaine stabilité mécanique. *In vivo*, une interface est indispensable pour répondre aux changements physiologiques et biologiques, l'intégration avec le tissu environnant pourra alors se faire correctement (El-Ghannam ; 2005). La réussite de la greffe d'un biomatériau est fortement liée à la production quantitative et qualitative de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes, elle améliore

l'attachement et l'adhésion des cellules hôtes à la surface du biomatériau et contrôle leur différenciation ostéogénique (Salasznyk, Williams *et al.*, 2004; Datta, Holtorf *et al.*, 2005).

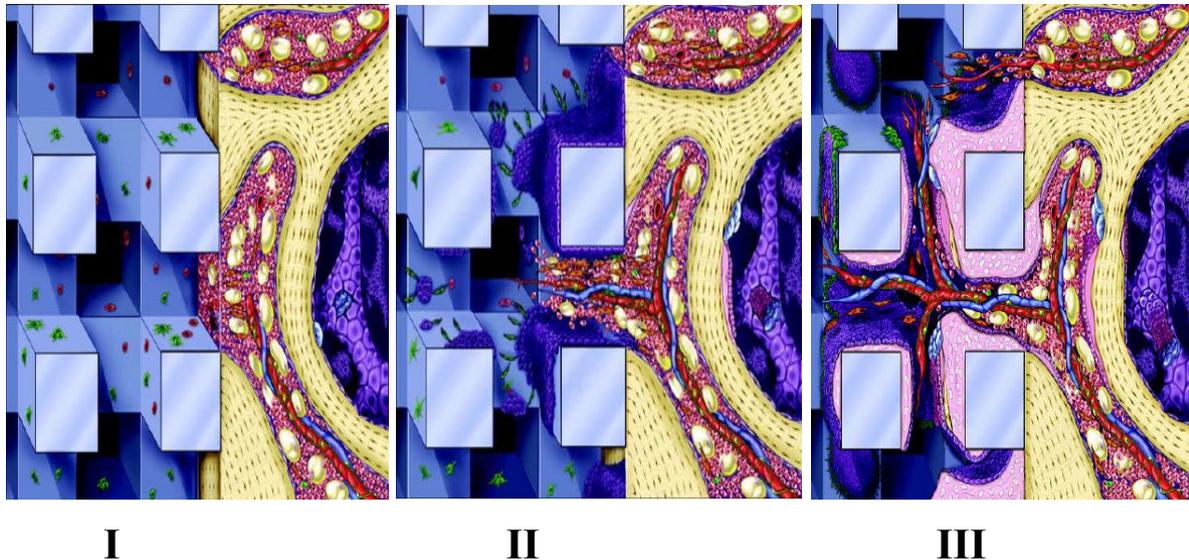


Figure 1. Illustration de la formation osseuse au niveau d'un biomatériau implanté avec des cellules ostéogéniques d'après Muschler *et al.*, 2004.

I Après implantation, les cellules ostéogéniques près de la surface de l'implant bénéficient d'un environnement quasi normal en termes de concentration en oxygène, glucose et autres nutriments. Les cellules situées plus en profondeur sont dans un environnement de plus en plus pauvre en oxygène et nutriments puisque toutes les cellules sont en compétition les unes avec les autres. L'hypoxie modérée constitue un stimulus pour leur prolifération et la sécrétion de cytokines chimioattractantes pour les cellules de l'hôte.

II cellules inflammatoires (roses), progéniteurs de l'hôte (orange) et des cellules endothéliales permettant l'angiogenèse. Avec l'arrivée des nouvelles cellules au sein de l'implant, la compétition pour l'oxygène et les nutriments augmente en attendant la vascularisation. On comprend à ce moment, la nécessité de limiter, au moment de l'implantation le nombre de cellules non ostéogéniques dans la matrice. Les cellules souches et progéniteurs ayant survécu et colonisé l'implant, se différencient pour former un réseau d'os non lamellaire (woven bone).

III Après un certain temps on peut observer un remodelage au niveau de l'implant et de l'os adjacent. Le woven bone est progressivement remplacé par de l'os lamellaire formant un

réseau interconnecté qui s'étend plus profondément dans l'implant. Un remodelage vasculaire se produit en parallèle. Les espaces délimités par les travées renferment des éléments médullaires. Des cellules souches et des ostéoprogéniteurs continuent de migrer vers le centre de l'implant.

I. 1. Du biomatériau de comblement osseux à l'ingénierie tissulaire osseuse

Les techniques **d'ingénierie tissulaire** permettent à ce jour de développer de nouvelles stratégies de médecine régénératrice pour le remplacement d'un organe. Ce champ pluridisciplinaire combine les savoirs et les procédés venant de la physique, la biologie cellulaire, l'ingénierie chimique et les sciences de la matière. Selon ce principe d'ingénierie tissulaire, les biomatériaux seront associés à des composantes cellulaires et/ou biochimiques (Vinatier *et al.*, 2011).

Les principaux acteurs sollicités par ces techniques de reconstruction tissulaire sont présentés dans la Figure 1. Il s'agit :

- d'un **biomatériau, d'une matrice tridimensionnelle,**
- de **cellules présentant une capacité ostéogénique,**
- des **facteurs bioactifs**, comme des facteurs de croissance, capables d'activer la fonction des cellules hébergées dans la matrice, ou d'activer les cellules hôtes,
- des **facteurs mécaniques.**

Le biomatériau aura pour mission de véhiculer les cellules dites « réparatrices » et de leur permettre d'initier un processus de régénération. Ce biomatériau peut être utilisé également comme un système de délivrance de cellules, de facteurs bioactifs afin de stimuler la régénération au niveau du site lésé. Ces deux approches ne sont pas exclusives et peuvent être combinées (Howard *et al.*, 2008). Ce **produit d'ingénierie tissulaire (PIT)** doit être capable de répondre à des stimulations mécaniques. Dans ce dernier cas, la culture de ces PIT dans des bioréacteurs est susceptible de fournir un environnement dynamique de culture et favoriser un meilleur transfert en oxygène et en nutriments.

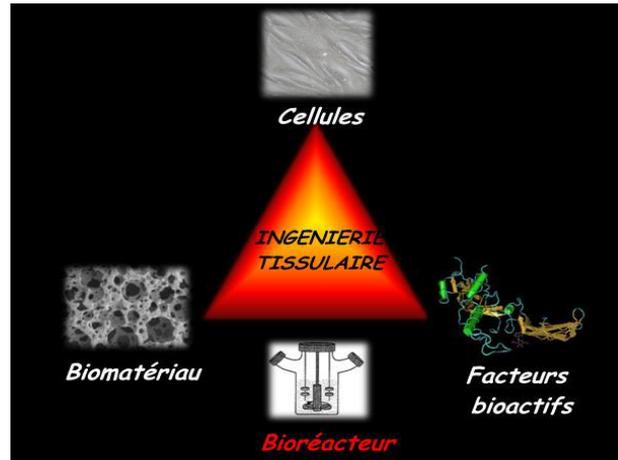


Figure 2. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire.

Le succès du développement de biomatériaux doit prendre en considération la façon dont leurs surfaces vont interagir avec les processus *in vivo*, tels que l'adsorption des protéines endogènes. L'interaction entre les protéines et la surface du matériau est cruciale pour le succès de l'implant (Yunzhi *et al.*, 2003 ; Ruhe *et al.*, 2004).

Actuellement, le corail et la nacre, composites d'origine naturelle, figurent parmi les biomatériaux les plus prometteurs en chirurgie osseuse (Hamza *et al.*, 2013).

Selon Chester, (1986) deux types de biomatériaux :

- les biomatériaux de comblement nécessaires pour combler des défauts volumineux d'os (tumeur, vieillissement) : ils incluent les autogreffes, les allogreffes, les xéno-greffes, des matériaux naturels comme le corail ou la nacre, les matériaux synthétiques comme les phosphates de calcium ou les bioverres, et enfin les polymères qui peuvent former des interfaces de type hydrogel favorables pour l'adsorption des protéines et donc l'adhérence cellulaire.
- les biomatériaux de substitution nécessaires pour remplacer une pièce squelettique (prothèses articulaires, implants dentaires). Nous ne discuterons ici que de biomatériaux de comblement.

I. 2. Les biomatériaux d'origine marine

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes de blessures ou de brûlures. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés.

Les biomatériaux recouvrent une grande variété d'applications biomédicales puisqu'ils peuvent être à la fois des matériaux de réparation des lésions tissulaires, des matériaux implantables et être constitutifs de systèmes d'assistance extra corporelle. Ils ne se définissent donc pas par une nature particulière mais par l'usage auquel on les destine : ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (*métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques, composites, bioverres, ...*) que des matériaux d'origine naturelle (*collagène et cellulose*), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique (*corail, nacre, ...*).

Aujourd'hui le **corail** et la **nacre** figurent ainsi parmi les biomatériaux les plus prometteurs en chirurgie osseuse. La chitine et la chitosane, composants de la carapace des crustacés sont utilisés comme additifs en cosmétologie et dans l'industrie papetière. Les exemples pourraient être multipliés. Pourtant, le nombre de ces utilisations semble infinitésimal au regard de l'inépuisable réservoirs de substances naturelles d'intérêt biologique que constituent les milieux marins (Hamza et Zouari 2008).

La greffe osseuse, le comblement de pertes de substance osseuse ou la réparation et la reconstruction sont de plus en plus fréquentes en chirurgie traumatologique ou orthopédique et de ce fait, elles génèrent des besoins croissants en produits de comblement ou de substitution osseuse.

La structure macroporeuse d'un substitut osseux permet la colonisation osseuse et la néovascularisation jusqu'au cœur du biomatériau. Toutefois, le pourcentage de macroporosité influence de manière importante la résistance mécanique qui diminue lorsque la macroporosité augmente. Le comportement mécanique d'un substitut osseux reste la propriété la plus délicate à maîtriser pour plusieurs raisons.

Le corail est un animal primitif proche des méduses, le terme corail recouvre plus de 7 000 espèces qui, bien qu'appartenant tous à un même groupe zoologique, sont différents par leur anatomie et leur organisation morphologique. Le corail rouge (*Corallium rubrum*) est un octocoralliaire ramifié à squelette calcaire rouge-orangé, formant des colonies, très utilisé en

joaillerie. Il appartient à un vaste embranchement zoologique relativement primitif, les Cnidaires, dans la classe des Anthozoaires, ordre des Gorgonacea, famille des Coralliidae, *Corallium rubrum*. Le corail rouge est une espèce typiquement méditerranéenne.

Les gisements de corail rouge des côtes nord-africaines s'étendent du détroit de *Gibraltar au golfe de Tunis*. Leur couleur rouge vermillon fait superbement ressortir les polypes blancs. Ceux-ci sont répartis sur tout le pourtour des rameaux, et sont plus abondants à leurs extrémités. Qu'en est-il de la symbiose avec les zooxanthelles et de la toxicité ?

Les tissus recouvrent un squelette axial entièrement minéralisé, formé de carbonate de calcium (CaCO₃) cristallisé en calcite. Les coraux naturels possèdent des propriétés de contrainte à la rupture à peu près comparables à celles de l'os humain frais (Hamza *et al.*, 2013).

Les résultats de l'implantation de corail montrent que ce dernier est un matériau ayant des caractéristiques très intéressantes pour l'utilisation dans les comblements des pertes des substances osseuses: excellente tolérance, ostéoconduction et résorption variable mais progressive avec remplacement par du tissu osseux néoformé.

En effet, ce biomatériau est biocompatible, et en site osseux il existe une bioactivité immédiate et secondaire par l'intermédiaire de mécanismes physico-chimiques (Kania *et al.* ; 1997).

Le corail est un autre substitut osseux résorbable composé de carbonate de calcium (aragonite ?) issu de la partie minérale du corail naturel. Sa biocompatibilité et son ostéointégration sont excellentes quel que soit le type de corail (Demers *et al.*, 2002). Cependant, la présence d'éléments organiques (principalement des résidus de protéines collagéniques et non collagéniques) suscitent d'importantes réactions inflammatoires. En outre, sa dégradation est trop rapide et limite son utilisation

I. 3. La nacre

Etymologie de **NACAR**, de l'italien naccaro; de l'arabe naqqara. Substance dure, blanche, à reflets irisés, qui tapisse la face interne de la coquille de nombreuses espèces de mollusques.

La nacre est un mélange de conchyoline (la phase organique de la nacre), et de carbonate de calcium (Grand Larousse Universel). La nacre est le revêtement intérieur de certains coquillages, composé de cristaux d'aragonite et de conchyoline.

Lorsqu'un élément étranger irrite dans la coquille de ces mollusques, ceux-ci secrètent également de la nacre couche après couche tout autour afin de s'en protéger. Le mélange des deux substances va progressivement se solidifier pour former de la nacre et neutraliser l'intrus. Ce sera le début de la naissance de la future perle. La neutralisation de l'ennemi créera un joyau. (The Pearl book).

La composition chimique de la nacre, varie en fonction de leur provenance, de l'état du mollusque, etc ...En gros, elle est constituée par:

- CaCO₃, 95-97 %
- Matières organiques 2-4 %-
- Oligoéléments (traces) 1-2 % (Poirot ; 1975).

I3. 1. Structure de la nacre

La nacre est un remarquable matériel composite qui résulte d'un processus de minéralisation biologiquement contrôlé. La nacre est constituée de plus de 95 % de carbonate de calcium cristallisé sous forme d'aragonite et de 1 à 5 % de matrice organique dont le rôle est, d'une part, de renforcer les propriétés mécaniques de la coquille et, d'autre part, de réguler de manière très précise la mise en place des cristaux d'aragonite ou de calcite (Zaremba *et al.*, 1998 ; Marin et Luquet., 2004). La matrice organique est composée de protéines, glycoprotéines, polysaccharides et de lipides (Addadi *et al.*, 2005).

L'association intime entre les matrices minérale et organique de la nacre donne une ultrastructure en « briques et mortier » où les briques représentent les cristaux d'aragonite et le mortier représente la fraction organique (Sarıkaya *et al.*, 1994).

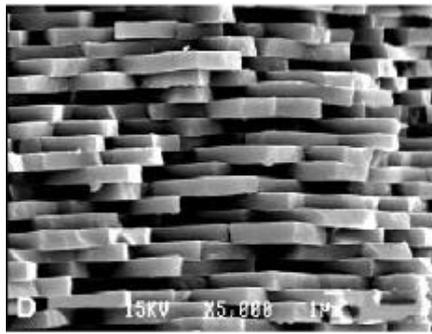


Figure 3. Structure en brique et mortier de la couche nacrière de l'huître perlière

Pinctada margaritifera (Rousseau *et al.*, 2009).

13. 2. Genèse de la nacre :

La nacre est le produit d'organismes vivants. Elle est sécrétée par de nombreux mollusques à coquille, comme les Pintadines (dites "huîtres perlières") et d'autres mollusques bivalves filtreurs (*Pinna*, *pteuia*, *Unio* - grosses moules d'eau douce). De nombreux gastéropodes (escargots de mer), *Haliotis* (ormeaux), *Trocas* de Nouvelle Calédonie, *Burgaus* des archipels mélanésiens et indonésiens et même des céphalopodes (nautilus) sont également producteurs de nacre.

La composition et la structure de la nacre varient avec l'espèce, l'alimentation du coquillage et la qualité de l'eau dans laquelle il vit entraînent des modifications dans les microstructures qui produisent par diffraction de la lumière des couleurs variées.

Le mollusque possède une membrane collée à la coquille que l'on appelle "le manteau".

(Manteau: enveloppe externe du corps de certains invertébrés (bivalves ...) qui sécrètent une coquille. Dans le cas de l'huître perlière, on parle de **manteau palléal**). Ce manteau sécrète les constituants de la coquille dont la nacre, durant toute la vie de l'animal.

La coquille est synthétisée à température ambiante. La construction de la coquille commence depuis le jeune âge par la sécrétion de lamelles organiques. Après, durant l'ontogenèse, ces lamelles deviennent le periostracum, qui est la couche externe de la coquille (Marin et Luquet, 2005 ; Checa, 2000).

Le processus de la genèse de la couche de nacre est étudié de façon à élucider le modèle du "pont-minéral", proposé pour la nacre d'*Haliotis* (Schäffer *et al.*, 1997) ou de *Mytilus*. La matrice organique constitue une phase continue à l'intérieur de la tablette alors que la phase minérale est discontinue. D'une rangée à l'autre, des ponts entièrement organiques existent. La bio-minéralisation de la nacre se produit suivant 5 étapes principales : (I) sécrétion du fluide extra-palléal, (II) mise en forme de ce fluide sous forme de compartiment, (III) nucléation, (IV) croissance des tablettes au sein du film et finalement (V) minéralisation complète du compartiment. La croissance et le développement des tablettes sont modélisés comme un pavage de Voronoi. Cette croissance se produit selon des processus d'auto-organisation au sein du film (théorie du compartiment ouvert) (Rousseau *et al.*, 2005).

Les évidences expérimentales rapportées permettent d'établir un modèle du front de croissance. Il est caractérisé par une structure en marches d'escalier. Le front de minéralisation concerne toute la surface de la coquille, simultanément.

Ce modèle permet d'expliquer par exemple, comment se produit le signal de nucléation ou expliquer comment se produit à la fois l'extension de la coquille dans la zone ventrale et son épaissement dans la zone dorsale (Rousseau *et al.*, 2005). Selon Addadi *et al.* (2006) présentent la formation de la nacre selon 4 étapes temporelles hypothétiques:

- Assemblage de la matrice : la chitine, sécrétée dans l'espace extrapalléal, s'autoorganise en un réseau tridimensionnel, tandis que l'espace compris entre les feuillets de chitine se remplit d'un gel de protéines hydrophobes contenant aussi les agents nucléants, les protéines acides. La première phase minérale formée est amorphe. Les minéraux amorphes pourraient être amenés par des vésicules, dans un environnement hydrophobe (bicouche lipidique), qui stabiliserait très transitoirement la phase amorphe.
- Nucléation des tablettes d'aragonite. Les « clusters » de groupements acides constitueraient les points où la nucléation cristalline s'opère, à partir des nanominéraux amorphes.
- Croissance des tablettes : ces dernières croîtraient tout d'abord verticalement, jusqu'à atteindre la couche supérieure de chitine, puis latéralement. Pour chaque tablette, c'est une croissance centrifuge, depuis le centre de nucléation vers la périphérie. La croissance latérale s'accompagne de l'expulsion du gel hydrophobe « hors » du

minéral. Lorsque les tablettes voisines entrent en confluence, ce gel polymérise pour donner la matrice fortement insoluble telle que l'on peut l'extraire sur des coquilles matures.

La nacre des bivalves possède alors une croissance orientée et le cristal formé possède trois axes de croissance qui sont co-orientés. La nacre est secrétée à partir du manteau. La transition entre la couche prismatique et nacrière est observée par microscopie électronique. Le prisme constituant la couche externe est généralement constitué par un seul cristal. Le changement de morphologie de cet prisme depuis son origine (la couche externe de la coquille) jusqu'à la couche nacrière est traité par plusieurs auteurs (Feng *et al.*, 2000 ; Rousseau *et al.*, 2005).

La compétition induit certains prismes à disparaître, ceux qui survivent se propagent à l'intérieur de la coquille (Fig. 3).

En plus, la couche organique intermédiaire est formée lorsque le manteau perd le contact avec la surface prismatique et cesse la sécrétion du carbonate de calcium. Durant cette période, les molécules organiques du liquide extrapalliale adhèrent à la surface de la coquille (Rousseau *et al.*, 2005).

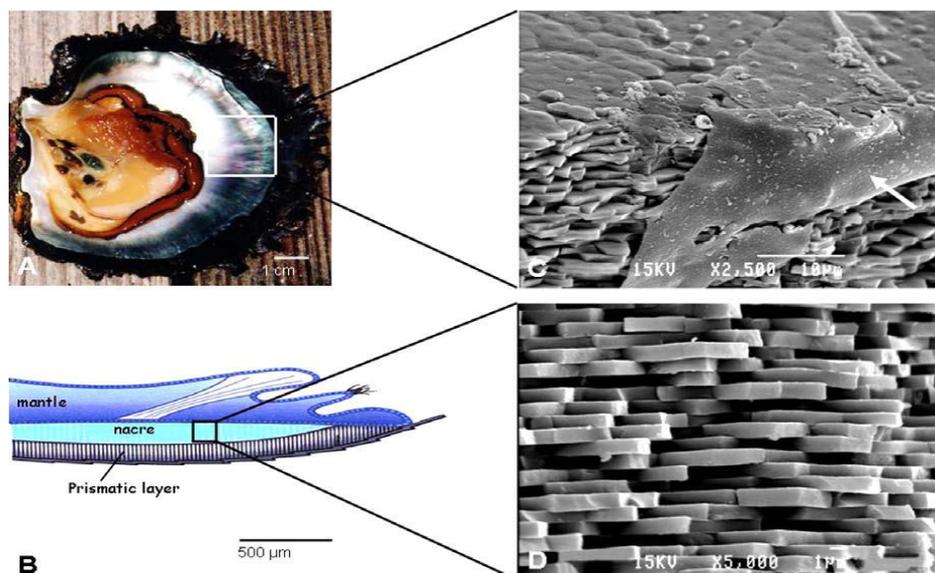


Figure 4. La coquille de l'huître *Pinctada margaritifera*.

(A) Coquille ouverte contenant l'animal. La couche brillante nacrée de l'aragonite est bien

visible sous l'animal. La couche nacrée plus sombre formant le manteau est une coquille prismatique de calcite formant l'enveloppe extérieure. (B) Schéma de la structure de la coquille et du manteau. (C) En retirant le manteau qui est en contact direct avec la coquille poussant en surface, les tablettes de nacre sont révélées après une fracture mécanique de la nacre. (D) La fracture de la coquille révèle la structure en brique et mortier des couches de nacre. Chaque couche a une épaisseur d'environ 0,5 à 1 mm (Adaptée de Rousseau *et coll.*, 2009).

La nacre a évolué depuis son apparition jusqu'à la maturité suivant une croissance bien organisée. Pendant cette évolution, les avants de croissance des lamelles de nacre change d'interprismatique en des lamelles ordonnées et enfin se propagent (Checa et Rodriguez-Navaro, 2005).

L'observation en microscopie électronique indique que la nacre formée au début est toujours polycristalin. Elle possède une orientation commune suivant un axe C, mais orienté au hasard avec les deux autres axes A et B. la réflexion de la calcite indique que l'axe C du prisme de la couche externe est perpendiculaire à la surface de la coquille et les axes A et B y sont parallèles mais tournent au hasard autour de l'axe C (Checa et Rodriguez-Navaro, 2005). La microstructure de la coquille des mollusques est un complexe de couches de calcite et /ou d'aragonite qui croissent simultanément (Chateigner *et al.*, 2000).

Chez les mollusques, la croissance dépend fortement des ions Calcium qui participent dans la formation et la répartition de la coquille. Le carbonate de calcium (CaCO_3) présent dans la coquille des mollusques dérive des ions calcium et carbonate présent dans le liquide extra-pallial. Ces ions qui passent à travers le manteau épithélium sont transportés dans la solution liant entre le manteau et la coquille. La matrice organique soluble dans l'eau possède une grande influence dans la croissance du carbonate de calcium (Heinemann *et al.*, 2006).

Le cristal de carbonate de calcium formé se dépose dans le fluide extra-palléal. Il s'agit du processus de biominéralisation qui implique le transport des ions et la régulation de leurs concentrations. La régulation du calcium est accomplie en partie par les échanges de ces ions avec l'environnement (Rousseau *et al.*, 2003), ainsi la succession des événements sécrétoires, permettant de passer d'un liquide précurseur à une phase minérale solide structurée.

I.3. 3. Intérêt économique

Les Pintadines produisent naturellement des perles d'excellente qualité (Fig.5). Le Golfe Persique produit à lui seul 80% de la production mondiale de perles naturelles (Al-Matar *et al.*, 1993). Afin d'augmenter cette production, une filière perliculture s'est installée.

Dans les fermes d'élevages des huîtres perlières, des incisions dans la gonade sont pratiquées, suivi de greffe d'un fragment de manteau. Ce greffon est considéré comme un corps étranger pour l'animal et une réaction de rejet se met en place. Au cours de cette réaction, l'huître secrète un produit (la nacre) avec lequel elle essaye d'envelopper et d'isoler ce corps étranger. Ainsi la perle est créée sous forme d'une sphère.



Figure 5. Valve droite contenant la perle de *Pinctada radiata*

La Pintadine est également sollicitée pour sa chaire consommée à l'état crue ou bien cuisinée et pour sa coquille utilisée dans la décoration (tableaux, meubles, arts de la table etc...), la joaillerie et la bijouterie fantaisie.

I.3. 4. Les propriétés biologiques de la nacre

On prend aujourd'hui de plus en plus conscience des propriétés uniques et surprenantes de la nacre. Provenant d'huîtres perlières géantes (*Pinctada maxima* et *Pinctada margaritifera*), elle reconstitue les os et régénère la peau.

La nacre possède des propriétés mécaniques exceptionnelles. En effet, la matière organique de la nacre est responsable de sa dureté qui est 3000 fois supérieure à celle de l'aragonite pure (Currey, 1997). Les travaux de Camprasse *et al.*, (1990) ont montré que les propriétés mécaniques de la nacre sont comparables à celles du titane. Outre ses caractéristiques mécaniques remarquables, la nacre renferme des substances stimulant l'ostéogenèse (Lopez *et al.*, 1994). Ces propriétés ont fait de cette substance d'origine marine un bon candidat pour servir de biomatériau non seulement de substitution osseuse, mais également de régénération osseuse (Westbroek et Marin, 1998). Les études *in vivo* et *in vitro* indiquent que la nacre contient une ou plusieurs molécules signales, qui peuvent activer l'ostéogenèse des cellules de la moelle osseuse et permettre la formation d'os (Lamghari *et al.*, 1999).

I3. 4.1. Etudes *in vivo*

L'implantation de fragments de nacre pour pallier à un défaut osseux induit une activité ostéogénique. La nacre est considérée par les tissus hôtes comme un véritable greffon.

Le premier résultat notable est la parfaite biocompatibilité de la nacre implantée puisque aucune réaction inflammatoire chronique n'est observée. L'interface os/nacre montre un ancrage direct de l'os sur la nacre résultant de la mise en place d'un microenvironnement ionique riche en calcium et en phosphate, qui est nécessaire à la néoformation osseuse (Berland *et al.*, 2005).

Un morceau de nacre a été implanté au niveau du fémur de mouton, 6 mois après l'intervention, un nouveau tissu s'est formé à la surface de la nacre. Ce tissu est composé d'os nouvellement formé. La réaction de reconstruction semble être un processus régulé physiologiquement, démontrant l'efficacité et la bonne tolérance de la nacre. Des îlots d'ossification endochondrale sont observés au niveau de l'implant de nacre, confirmant que les événements d'ossification endochondrale sont reproduits pendant le processus de réparation (Fig.6) (Delattre, 2000).

De la poudre de nacre a été injectée dans les vertèbres et au niveau du site maxillaire de mouton. Les résultats ont montré que la poudre de nacre était résorbable et qu'elle induisait

une nouvelle formation d'os. La poudre de nacre remplit la cavité 1 semaine après l'injection sans produire de réaction inflammatoire et 8 semaines après l'injection, la poudre de nacre est dissoute et l'angiogenèse commence. La cavité contient le nouvel os qui est fonctionnel comme l'os normal (Fig.7) (Lamghari *et al.*, 2001).

I3. 4.2. Etudes in vitro

Les molécules extraites de la nacre sont reconnues par les cellules du squelette, du cartilage et par les cellules de la peau. Les molécules présentes dans la nacre peuvent réguler le métabolisme osseux et peuvent également participer à la réparation des déficits osseux.

La matrice organique de la nacre a la faculté d'induire la stimulation des cellules osseuses et cartilagineuses, ainsi que de leurs précurseurs pour réparer et entretenir le capital osseux

(Moutahir-Belquasmi *et al.*, 2001). Une étude a été réalisée sur des molécules présentes dans la nacre pour évaluer leur effet sur une lignée pré-ostéoblastiques de souris (lignée MC3T3-E1). Les molécules de la nacre ont induit une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et ont induit la formation de nodules osseux. Les molécules présentes dans la nacre stimulent rapidement les premières étapes de la différenciation osseuse en activant l'expression de *Runx2* et de *Col I* puis induisent les étapes tardives en activant la transcription de l'ostéopontine, qui est une protéine d'adhérence du tissu osseux, et la formation de matrice extra-cellulaire (Rousseau *et al.*, 2007).

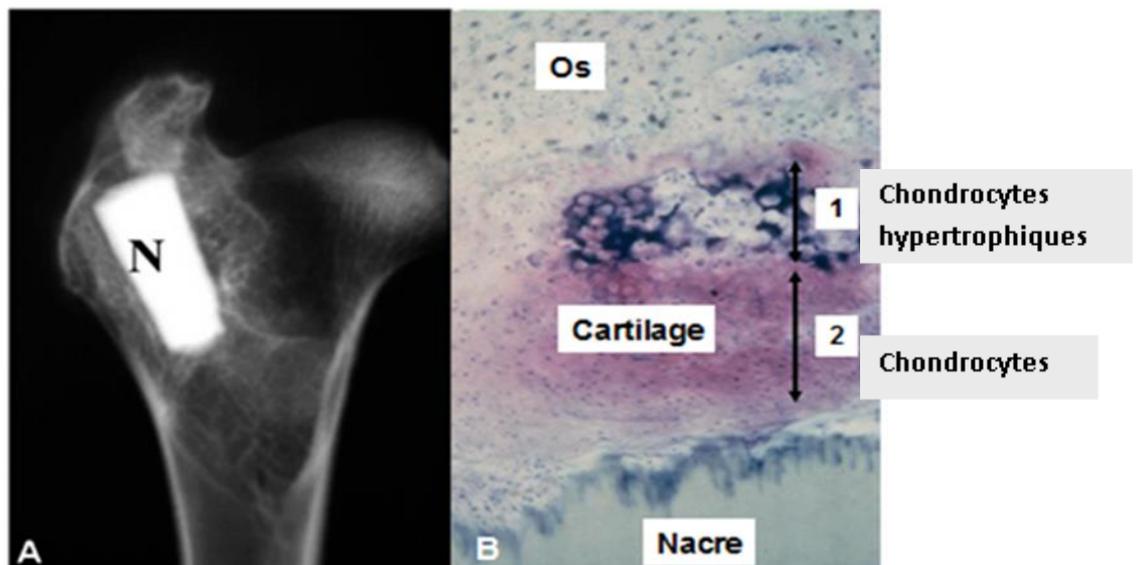


Figure 6. Implantation d'un morceau de nacre au niveau d'un fémur de mouton.

A- Image radiographique du fémur de mouton 10 mois après l'implantation, montrant la préservation de la taille et de la forme du morceau de nacre (N) et le contact entre l'implant et l'os spongieux environnant.

B- Formation d'îlots d'ossification endochondrale au niveau de l'implant de nacre, montrant la différenciation des cellules entre la nacre et l'os spongieux : les chondrocytes et les chondrocytes hypertrophiques. Après coloration à la fuchsine basique et bleu toluidine (B:×16). (Adaptée d'Atlan *et al.*, 1999 ; Rousseau, 2011).

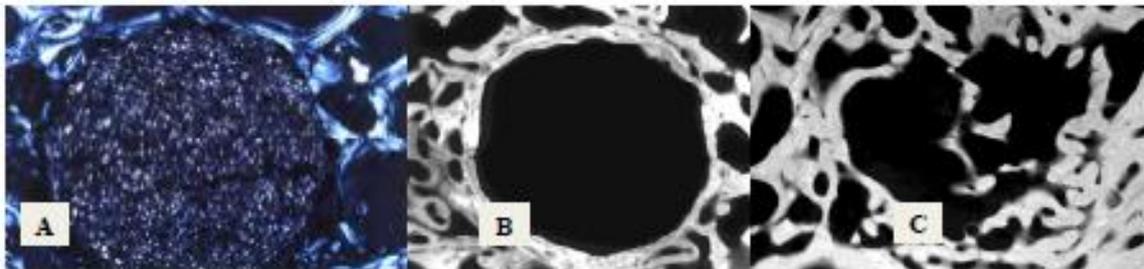


Figure 7. Injection de poudre de nacre dans les vertèbres de mouton.

A – La cavité est remplie par la nacre (A, x25).

B – Après 8 semaines, dans la cavité vide (témoin sans nacre), l'os s'organise en anneaux concentriques.

C – La poudre de nacre est remplacée par de l'os tissé nouvellement formé (Lamghari *et al.*, 2001).

I.3. 5. Formation des os

Le développement foetal de l'os se fait de deux façons qui impliquent toutes deux le remplacement de tissu conjonctif par du tissu osseux.

Les os de la voûte crânienne, des maxillaires et de la plus grande partie des mandibules sont formés par ossification de type membranaire caractérisée par le remplacement direct du mésenchyme par de l'os. L'os est appelé os membraneux. Au contraire, les os longs, les vertèbres, les os pelviens et les os de la base du crâne sont précédés par un tissu cartilagineux. L'os est appelé os endochondral.

Les grandes étapes de l'ostéogenèse sont caractérisées par l'engagement, la prolifération et la différenciation de cellules souches pluripotentes, qui se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse (Fig. 8).

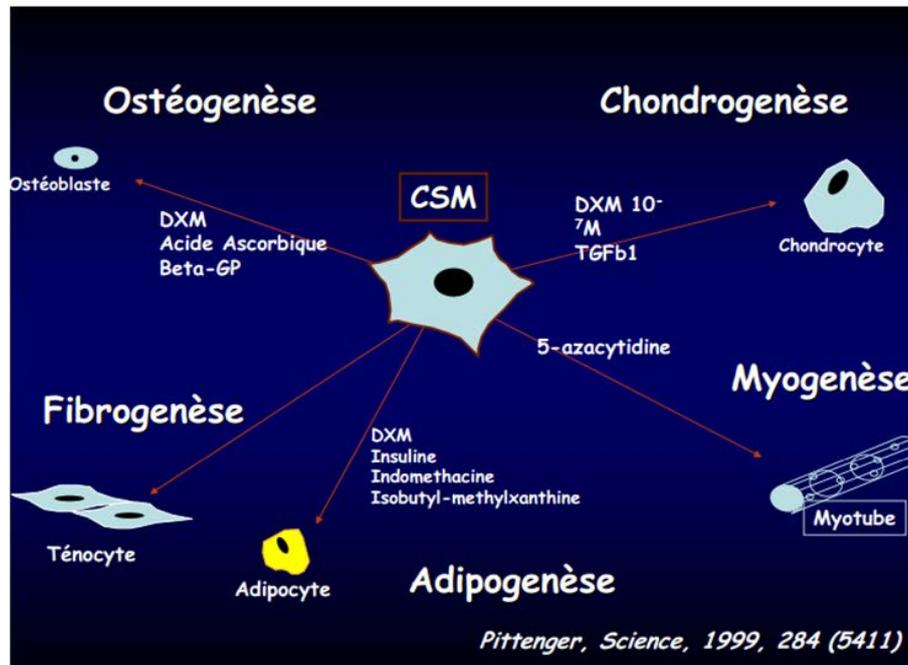


Figure 8. Différenciation d'une cellule souche mésenchymateuse (Pittenger ; 1999).

I.3. 5. a. Remodelage osseux

Le cycle débute par l'activation des précurseurs des ostéoclastes (pré-ostéoclastes) et leur différenciation (Fig. 9). Ceux-ci détruisent la matrice osseuse puis entrent en apoptose.

Parallèlement les précurseurs ostéoblastiques (pré-ostéoblastes) sont activés et se différencient en ostéoblastes. Ils synthétisent, en arrière du front des ostéoclastes, l'os neuf et remplissent d'abord la cavité de matrice extracellulaire organique, la matrice ostéoïde, qui ensuite se minéralise. A la fin de la formation, une partie des ostéoblastes meurt par apoptose ; l'autre partie devient un ensemble d'ostéocytes inclus dans la matrice osseuse et des cellules bordantes qui recouvrent la surface de l'os à l'état quiescent.

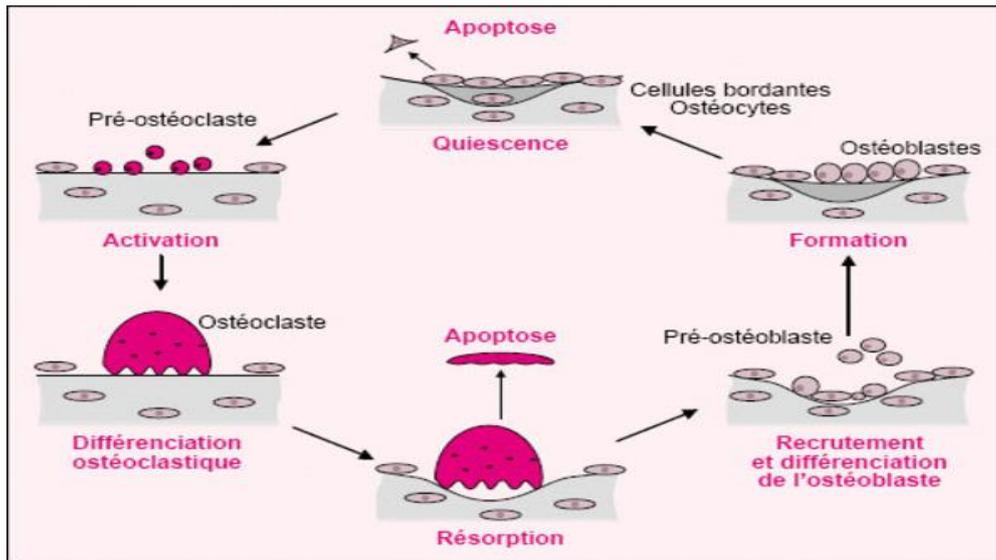


Figure 9. Place de l'ostéoblaste au cours du cycle de remodelage osseux.

Le cycle de remodelage débute par une phase d'activation, caractérisée par la différenciation des ostéoclastes, suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes. À la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, puis les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice comblant la lacune de résorption. À la fin de cette phase de formation, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, subissent un phénomène d'apoptose ou se laissent inclure dans la matrice en devenant des ostéocytes. (Pierre Marie; 2001).

I.3. 5. b. Ostéointégration

Les processus moléculaires et cellulaires impliqués dans la formation osseuse sont assez bien connus. Néanmoins, chercheurs et cliniciens sont à la recherche de solutions thérapeutiques capables d'augmenter l'ostéof ormation dans le cas de maladies osseuses et de nombreuses études restent à mener. L'ostéof ormation s'effectue en deux étapes :

□ **L'Ostéoinduction** est la capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisée (définition de GESTO, Groupe d'Etude des Sciences du Tissu Osseux). Ce phénomène nécessite un stimulus inductif permettant un recrutement de cellules non engagées dans la voie ostéoblastique.

□ **L'Ostéogénèse** caractérise la capacité des cellules génétiquement prédifférenciées d'évoluer en pré-ostéoblastes et en ostéoblastes. Ce phénomène se produit pendant la régénération osseuse.

L'ostéointégration est le concept biologique de l'implantologie contemporaine. Elle n'est repandue et appliquée q

ue depuis 1985 (Branemark). Avant cette date le concept régisseur était celui de la fibrointégration (Babbush *et al.*, 1972, Meenaghan *et al.*, 1974), de l'interposition entre l'implant et l'os d'un tissu fibreux conjonctif sorte de «ligament peri-implantaire» dont les fibres sont parallèles aux surfaces de l'os et de l'implant contrairement au desmodonte dont les fibres ancrées dans le ciment et dans l'os sont perpendiculaires à cette même surface (Bert *et al.*, 1987).

Ce concept fut abandonné en raison des faibles taux de succès (40% au maxillaire, 70% à la mandibule) la perte de l'implant à terme, via un processus d'ostéolyse inflammatoire puis infectieux, était inévitable.

L'ostéointégration au contraire est basée sur la nécessité d'obtenir un contact direct entre l'os et l'implant, garant de résultats à très long terme. Pour atteindre cet objectif l'implant et les techniques chirurgicales de sa mise en place doivent remplir un certain nombre de conditions.

Le terme ostéointégration décrit une réponse osseuse fonctionnelle à un implant sans décrire les différentes réactions qui peuvent y conduire. Parmi ces réactions citons donc :

- L'ostéogénèse de contact : la néoformation osseuse débute directement à partir de la surface de l'implant (ex : implant en titane à surface rugueuse mordancée Davies 2003).
- L'ostéogénèse à distance : la néoformation osseuse commence à partir de l'os adjacent préexistant (ex : implant en titane à surface lisse Davies 2003).
- L'osteoconduction : un matériau ou une surface sont dits osteoconducteurs quand ils entraînent une ostéogénèse de contact. Cette capacité leur est propre : elle est plus ou moins importante d'un élément à l'autre.
- L'osteoinduction : décrit la capacité de certains matériaux ou surfaces à induire la néoformation de tissu osseux dans un environnement tissulaire non destiné à former de l'os (ex à son contact immédiat l'hydroxyapatite poreuse peut induire une ostéogénèse dans un muscle)

Ostéogenèse de contact : Les cellules ostéogéniques se stabilisent à la surface et continuent leur différenciation en ostéoblastes : elles secrètent tout d'abord une matrice non collagénique riche en osteopontine et scialoprotéine qui se minéralise immédiatement. Elle est l'équivalent de la lignée cimentaire que l'on rencontre systématiquement lors de toute action de remodelage. Elles secrètent ensuite un os fibrillaire reconnaissable par ses fibres de collagène minéralisées et désorganisées. L'apposition se poursuit des ostéoblastes secrétant sont inclus dans la matrice osseuse et se différencient en ostéocytes. L'apposition se poursuit de manière centrifuge et centripète afin d'immobiliser l'implant dans la structure osseuse (Fig.10).

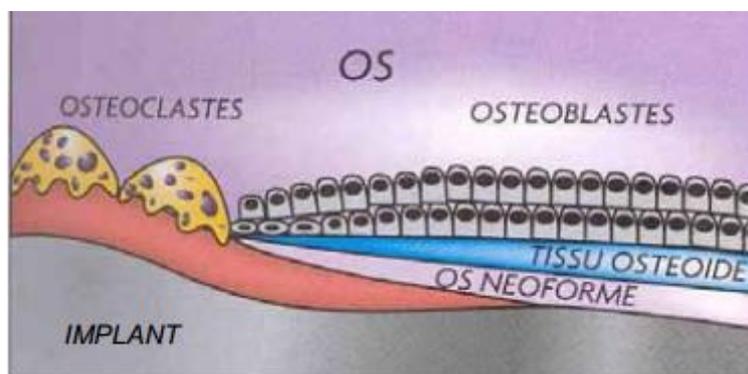


Figure. 10 Remaniement osseux : phase de resorption et d'apposition

(Manuel d'implantologie clinique Edition CdP)

▪ Ostéogenèse à distance L'apposition osseuse se fait depuis la couche adjacente la plus stable c'est-à-dire les berges du trait de forage. Comme précédemment la matrice non collagénique riche en osteopontine et scialoprotéine et secrétée puis minéralisée. Les cellules continuent leur activité d'apposition osseuse de manière centripète en produisant un os fibrillaire destiné à se remodeler en os lamellaire puis haversien.

I.3.6. Utilisations dans le domaine médical en tant que substitut osseux : Les Potentialités ostéogènes de la Nacre

La nacre sous forme de poudre est présente, depuis l'Antiquité, dans les pharmacopées traditionnelles égyptiennes, amérindiennes et asiatiques. Les Mayas ont été les premiers à l'utiliser pour ses qualités physiques. En effet, en examinant des crânes amérindiens datant de 4 000 ans, le paléontologue Amadeo (1972) découvre que les Mayas remplaçaient les dents disparues par des fragments de nacre qui apparaissent bien soudés à l'os du maxillaire et semble être bien tolérés biologiquement.

Si les Mayas l'ont utilisée de façon empirique, cette substance naturelle intéresse aujourd'hui les physiciens, les minéralogistes et les biologistes, qui ont passé de l'étude théorique aux expérimentations humaines (Camprasse *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992 ; Atlan *et al.*, 1997) et animales (Atlan *et al.*, 1999 ; Lopez *et al.*, 2000; Milet *et al.*, 2004 ; Lahmeri 2007).

Les radiographies montrent que la nacre est parfaitement ostéointégrée. Os et nacre semblent donc partager, au-delà de leur distance évolutive, certains mécanismes de contrôle de la biominéralisation. Afin de vérifier cette hypothèse, l'équipe du Pr Lopez (1992) a mené des expériences *in vitro* qui consistaient à mettre un fragment de nacre en contact avec des ostéoblastes en culture (Fig.11). Les observations faites montrent que la nacre est reconnue par les cellules osseuses : elle stimule la prolifération des ostéoblastes à son contact et induit la production d'une nouvelle matrice organique sans développer de toxicité cellulaire.



Figure 11. Réaction autour d'un fragment de nacre posé dans une culture cellulaire d'ostéoblastes humain. Caractère Ostéogénique de la nacre (Lopez *et al.*, 1992).

En site crânien, le phénomène d'ostéoinduction provoqué par la nacre a été démontré *in vivo* : il se déroule complètement jusqu'à l'obtention d'os mature (Le Faou, 1996). Ces résultats ont également été confirmés avec un os maxillaire : en effet, des études *in vivo* ont été conduites et l'équipe du Pr Lopez (Atlan *et al.*, 1997) ont placé de la poudre de nacre provenant de *Pinctada maxima* dans des os de patients porteurs de déficits osseux. Ils ont constaté que les implants étaient parfaitement tolérés : la nacre a subi une biodissolution et a été remplacée par un os néoformé. Deux ans plus tard, un fragment de nacre a été placé au sein d'un fémur : une activité cellulaire, moléculaire et ionique a été démontrée à l'interface os/nacre (Atlan *et al.*, 1999). La nacre manifeste donc les trois propriétés qui la rapprochent de l'os, *i.e.* ostéoconduction, propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse,

ostéoinduction et ostéogénèse. Ces chercheurs ont suggéré l'existence de molécules signal contenues dans la nacre qui stimuleraient la régénération osseuse.

Ces molécules organiques ont ainsi été extraites et ont démontré une stimulation de la phosphatase alcaline, marqueur de la différenciation des ostéoblastes (Lamghari *et al.*, 1999). De nombreuses études ont donc été conduites sur les relations entre cette fraction soluble extraite à l'eau et la formation de l'os; il a été prouvé que l'extrait stimulait la production de phosphatase alcaline ainsi qu'une baisse simultanée de la production de protéines : c'est la phase d'ostéoinduction, i.e. la différenciation cellulaire (Almeida *et al.*, 2000 ; Pereira-Mouries, 2003). Cette fraction soluble a été démontrée également compétente pour stimuler toutes les cellules de la lignée osseuse et même accélérer le processus de différenciation et de minéralisation de l'os (Rousseau *et al.*, 2003 ; Pereira-Mouries, 2003).

La matrice organique isolée de la nacre peut donc induire la stimulation des cellules osseuses et cartilagineuses ; elle peut même induire la stimulation de leurs précurseurs non seulement pour réparer ou entretenir ces tissus mais aussi aboutir à la formation finale de tissus physiologiquement sains et actifs. Elle est biocompatible, ostéoinductrice et ostéogénique.

Des fragments de nacre, implantés *in vivo*, en site endo-osseux chez l'animal comme implant prothétique induisent une activité ostéogénique de la part du tissu osseux receveur. En effet, des cellules ostéoprogénique situées tout autour de l'implant se sont activées et une cascade de mécanismes pour la formation d'un nouvel os s'est mise en place (Atlan *et al.*, 1999 ; Lamghari *et al.*, 2001a ; 2001b).

Le premier résultat notable de cette expérimentation est l'absence de réaction inflammatoire chronique en réaction à un corps étranger témoignant une parfaite biocompatibilité (Milet *et al.*, 2004). Les études post-opératoires histologiques et microradiographiques ont prouvé que la nacre a été étroitement liée à l'os récemment formé. Elle était graduellement bio-dissolvable et a remplacé en premier temps l'os lamellaire non mûr et par la suite l'os lamellaire mûr (Atlan *et al.*, 1997). Le second est l'ostéointégration de la nacre dans le tissu osseux néoformé. L'analyse en microscopie électronique de l'interface os/nacre montre que l'ancrage direct de l'os sur la nacre est précédé par une phase d'activation cellulaire dans le tissu hôte et par la mise en place, à la surface de la nacre, d'un micro-environnement ionique riche en calcium et en phosphate (Atlan *et al.*, 1999).

La présence des molécules actives sur l'ostéogénèse dans l'extrait hydrosoluble de la matrice organique de la nacre de *Pinctada* est confirmée *in vitro* sur les cellules formatrices d'os ainsi que sur leurs précurseurs : des cellules stromales de la moelle osseuse (rat), des fibroblastes

(humains) et des ostéoblastes (murins) à différents stades de maturation (Lopez *et al.*, 1992; Pereira-Mouries *et al.*, 2002). Les résultats obtenus montrent que le potentiel ostéogénique des molécules signaux stockés dans la matrice organique de la nacre s'exprime sur des cellules de la lignée osseuse, des cellules souches d'ostéoblastes et sur des fibroblastes lors de leur recrutement (Milet *et al.*, 2004).

Ces propriétés de la nacre en font un biomatériau d'excellence pour la régénération osseuse.

II. L'os

La substance osseuse proprement dite est constituée d'une trame organique (21%), d'une phase minérale (70%) et d'eau (9%). L'os est un tissu conjonctif solidifié composé d'une phase minérale et d'une matrice organique. La phase minérale représente les 2/3 du poids de l'os et son composant majoritaire est l'hydroxyapatite, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mais on retrouve aussi des cristaux amorphes de phosphate de calcium ou de carbonate de calcium. Le tiers du poids restant étant la matrice organique c'est-à-dire du collagène type I essentiellement mais aussi diverses protéines, l'ensemble étant produit par les ostéoblastes (Hill, 1998). Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé, comme tout tissu conjonctif, de cellules enchâssées dans une matrice extracellulaire très abondante. Contrairement aux autres tissus conjonctifs, le tissu osseux possède une matrice extracellulaire minéralisée.

C'est cette minéralisation qui confère à la matrice une rigidité permettant au squelette d'assurer sa fonction biomécanique (soutien et protection des organes). Mais cette fonction purement mécanique n'est pas sa seule charge, l'os possède également une fonction métabolique car il est le principal réservoir de l'organisme pour le calcium (99 %), le phosphore (75 %), le sodium (90 %) et le magnésium (50 %) et il en régule l'homéostasie (Glimcher ; 1987).

Le reste du calcium est sous forme circulante ou assimilé par les cellules (0,5 %). Quant au phosphore, principal support de l'énergie (ATP), après l'os c'est au sein des cellules qu'il est le plus abondant (24 %). Cette homéostasie est rendue possible par la capacité de ce tissu à être en perpétuel remaniement. En effet, de l'embryon jusqu'à la fin de la vie, l'os est en permanence résorbé par les ostéoclastes et produit par les ostéoblastes (Hollinger ; 1996).

Ce métabolisme permet au tissu osseux de libérer ou stocker ces sels minéraux (Rho *et al.*, 1998) indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. L'os, enfin, joue un rôle hématopoïétique puisqu'il contient la moelle osseuse. La moelle osseuse grâce à la moelle

rouge située dans la partie spongieuse de l'os, produit les différents types de cellules sanguines que sont les érythrocytes, les thrombocytes et les leucocytes dérivés des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Une CSH qui se divise va donner naissance à une nouvelle CSH afin de maintenir le pool de cellules ainsi qu'à une cellule fille progénitrice capable de se différencier dans les trois types de cellules sanguines. La moelle osseuse contient également les cellules souches mésenchymateuses (CSM) capables de produire différentes lignées cellulaires (ténocytes, myoblastes, adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes).

Ces cellules sont fondamentales pour la formation, la cicatrisation et le remodelage du tissu osseux. Le dernier rôle du tissu osseux, récemment mis en avant, est l'homéostasie énergétique.

En effet, le tissu osseux qui ne dépense que très peu d'énergie semblerait jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique par son interaction avec l'insuline (Lee *et al.*, 2007). Récemment il a été montré que l'insuline via des récepteurs à l'insuline présents à la surface des ostéoblastes stimulait leur différenciation ainsi que la production d'ostéocalcine qui en retour régulait la sensibilité à l'insuline et sa sécrétion pancréatique (Fulzele *et al.*, 2007). Le tissu osseux permet d'assurer la croissance du corps et des organes, il a l'incroyable capacité de consolider spontanément après fracture avec une restitution *ad integrum* de sa structure, ce qui n'est le cas pour aucun autre tissu mou conjonctif, comme par exemple les ligaments, dont la cicatrisation ne peut restituer l'ensemble des qualités mécaniques originelles. Néanmoins, lors de pertes de substances, le tissu osseux n'est pas apte à se régénérer spontanément, il est donc nécessaire d'intervenir afin de combler ces pertes de substance et ainsi préserver l'intégrité du tissu osseux qui est un élément indispensable aux fonctions motrices et métaboliques du corps humain.

II. 1. La matrice extracellulaire osseuse

L'os est un tissu conjonctif dont les éléments cellulaires sont inclus dans une matrice extracellulaire (MEC) occupant environ 90% du volume tissulaire. Elle est composée de deux fractions : une phase minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite, liée à une phase organique constituée principalement de collagène de type I (Fig.12).

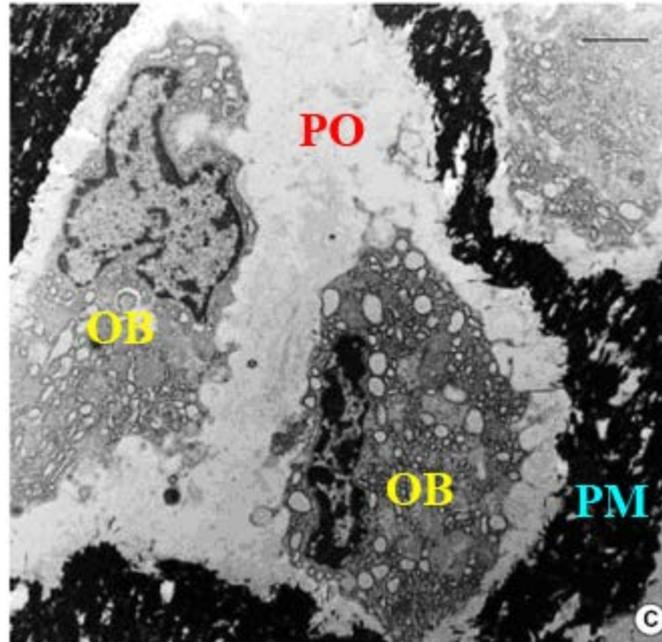


Figure 12. Ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire composée des deux phases : organique (PO) et minérale (PM). La barre d'échelle représente 2 μm (Choi *et al.*, 2002)

- La matrice extracellulaire organique osseuse représente environ 35% du poids sec osseux. Elle comprend 90% de collagène de type 1 c'est l'élément majoritaire (Goldgerg, 1989), 1% de facteurs de croissance, de l'ostéocalcine et de l'ostéonectine. Elle assure un rôle de maintien des cellules au sein d'une maille de protéines extracellulaires. Elle joue aussi un rôle complexe et actif dans le métabolisme cellulaire et dans la régulation du comportement des cellules qui sont en contact avec elle.

- La matrice extracellulaire inorganique osseuse, ou matrice minéralisée correspond à 60-70% de l'os sec. Elle contient environ 99% du calcium, 85% du phosphore et de 40 à 60% du sodium et du magnésium présents dans l'organisme humain.

II. 2. Les différents types de tissu osseux

Le squelette humain est composé d'environ 270 os à la naissance et en comprend en moyenne 206 à l'âge adulte après fusion de certains d'entre eux (Tortora et Derrickson ; 2007).

On peut retrouver le tissu osseux primaire (Le premier tissu osseux ou tissu fibreux) chez l'adulte au cours de la réparation osseuse après une fracture ou dans certaines pathologies osseuses (tumeurs, dysplasie). Ce tissu fibreux est remplacé par le tissu lamellaire (ou secondaire) composé de fibres de collagènes qui servent de support aux sels de calcium aboutissant à la formation de lamelles rigides. En fonction de l'agencement de ces lamelles,

on peut distinguer : l'os cortical (ou compact) qui représente 80 % de la masse osseuse, l'os trabéculaire (ou spongieux) représentant 10 % et l'os périostique (ou périoste) (Weiner *et al.*, 1999).

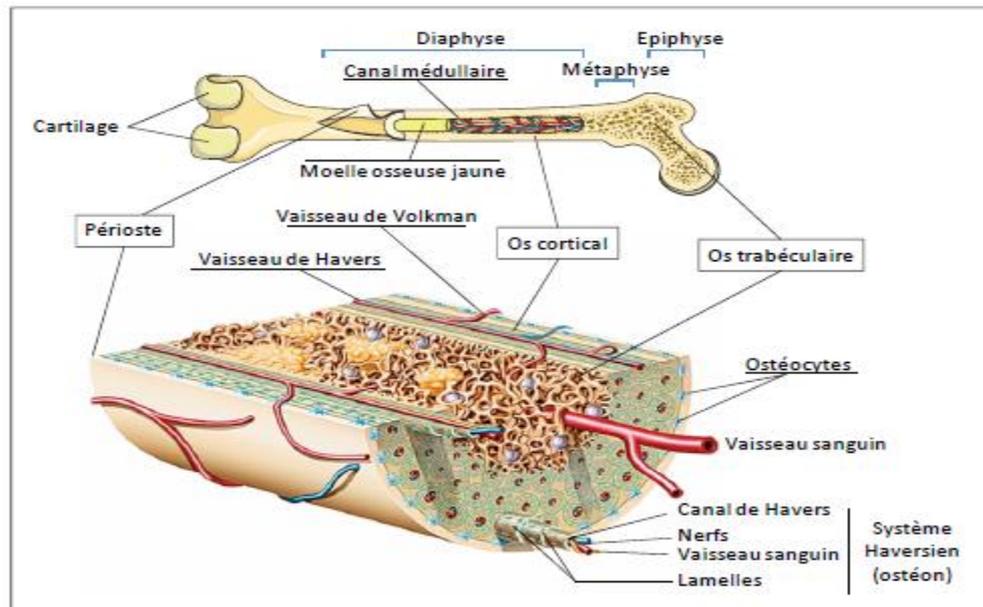


Figure 13 : Composition et structure d'un os long. Figure adaptée de Servier Medical Art et du Larousse médical.

II. 2. 1. L'os cortical

L'os cortical également nommée compact ou Haversien, représente 80% de la masse totale osseuse. Il constitue l'enveloppe des os plats et courts et la périphérie de la diaphyse des os longs, où il délimite un canal central occupé par la moelle osseuse ("moelle rouge", occupé par des progéniteurs hématopoïétiques chez l'enfant et "moelle jaune", occupée principalement par du tissu adipeux, chez l'adulte).

C'est un os dense, organisé en structures cylindriques orientées le long de l'axe principal de l'os et construites autour des vaisseaux sanguins. Ces structures, appelés ostéons, ou systèmes de Havers, résultent de l'activité de modelage au cours de la croissance et de l'activité de remodelage chez l'adulte.

Chaque ostéon, dont le diamètre varie entre 200 et 300 μ m, est composé de lamelles concentriques de collagène de type I minéralisées (de 5 à 20) qui délimitent un canal central nommé canal de Havers, de 50 μ m de diamètre. Ils sont orientés, dans les os longs, parallèlement à la diaphyse, conférant ainsi à l'os cortical une résistance optimale aux contraintes mécaniques, du fait que les ostéons suivent les lignes de forces exercées sur l'os. Les ostéons servent aussi de passage à des capillaires, artérioles, nerfs amyéliniques et canaux

lymphatiques. Chaque paquet neuro-lympho-vasculaires s'anastomose alors avec l'endoste et le périoste par les canaux de Volkmann, orientés perpendiculairement ou obliquement par rapport aux canaux de Havers.

La densité de l'os cortical en fait un réservoir important de calcium mais il représente seulement 20% des surfaces accessibles aux échanges, ce qui explique qu'il soit métaboliquement peu actif. (Gray's anatomy, 35th edit Longman Edinburgh, 1973).

II. 2. 2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire ou spongieux est un tissu ayant une architecture spongieuse constituée de fibres de collagène plus ou moins orientées de la même façon et formant des lamelles osseuses (généralement peu nombreuses) associées en travées (Fig.13). Comme décrit précédemment pour l'os cortical, ce sont ces lamelles qui contiennent les ostéocytes. L'os trabéculaire forme un réseau tridimensionnel que l'on retrouve principalement au niveau des os courts, des os plats (diploé) et au niveau de l'épiphyse des os longs.

Cet os est formé par de nombreuses trabécules séparant de volumineuses cavités irrégulières très largement interconnectées.

C'est dans ces cavités que se trouvent les vaisseaux sanguins et très souvent la moelle osseuse rouge hématogène (formation des cellules sanguines).

La présence de cette moelle rouge rend l'os trabéculaire métaboliquement plus actif et fait qu'il est plus souvent remodelé que l'os cortical. Bien que l'os trabéculaire soit de même composition que l'os cortical, celui-ci est beaucoup plus poreux. Les nombreuses cavités qui forment cet os lui donnent son nom d'os trabéculaire (ou spongieux). Cette porosité représente de 50 à 90 % du volume et fait de lui un os beaucoup moins dense et donc beaucoup plus fragile que l'os cortical (Buckwalter *et al.*, 1996).

II.3. Les cellules du métabolisme osseux

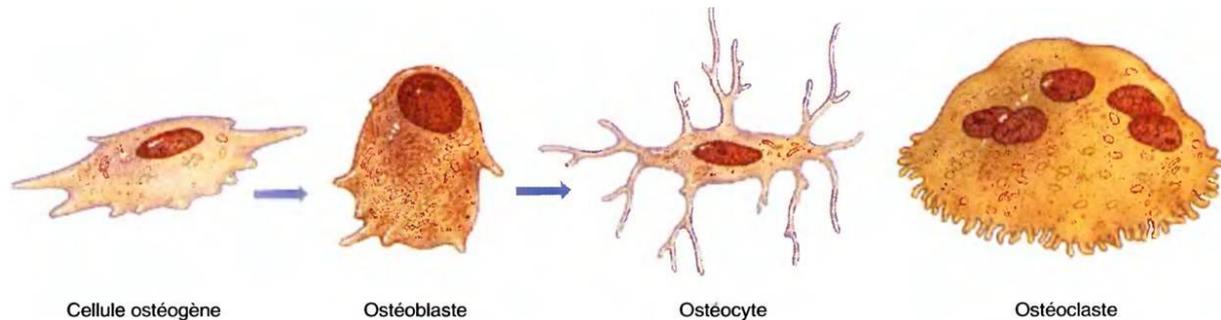


Figure 14. <http://www.casimages.com/img.php?i=13011107180614676010750963.jpg>

II.3.1. Les ostéoblastes

Ces cellules sont issues de cellule précurseur pluripotentes mésenchymateuses. Les ostéoblastes ont pour origine les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire.

Ces cellules mononuclées, disposées en couches monocellulaires sur les surfaces osseuses, ont pour fonction d'élaborer un os nouveau après l'action des ostéoclastes (il faut 100 à 1000 ostéoblastes pour reconstituer le volume d'os résorbé par un ostéoclaste). Leur principale fonction est de synthétiser le tissu ostéoïde et de participer à sa minéralisation.

Au cours de la formation du tissu osseux, les ostéoblastes vont se différencier et perdre de leur activité. Certains vont s'incorporer dans la matrice osseuse et devenir des ostéocytes, d'autres vont s'aplatir sur la surface de l'os, on les appelle les cellules bordantes (Bone Lining Cells). Ces dernières participent à l'activité métabolique de l'os, elles permettent aussi de réguler le flux d'ions entre la moelle osseuse et l'os via la barrière qu'elles forment en s'unissant les unes aux autres. Et enfin d'autres vont mourir par apoptose.

II.3.1.a. Ostéoblaste et matrice

L'ostéoconduction est la capacité d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par ces capacités à induire l'attachement, la prolifération, la migration et l'expression phénotypique des cellules osseuses. L'ostéoinduction est la propriété d'un matériau à induire la différenciation de progéniteurs pour finalement former du tissu osseux, pouvant se produire de façon ectopique La bioactivité est définie comme la propriété d'un matériau à développer un lien avec le tissu de l'hôte.

Ces quelques définitions (Ben-Nissan et LeGeros, 2008) illustrent la biocompatibilité d'un matériau, largement dépendante de ses propriétés physico-chimiques. Les ostéoblastes doivent en effet intégrer les informations biochimiques, mais aussi les informations mécaniques provenant de leur environnement, afin d'établir une réponse appropriée. En termes de topographie, il est bien établi que les ostéoblastes répondent à la rugosité ainsi qu'à l'organisation des anfractuosités de leur support de culture. L'augmentation de la rugosité permet une augmentation de l'adhérence cellulaire (Anselme, 2000; Keller *et al.*, 2003), de la différenciation (Hatano *et al.*, 1999), de la production de facteurs de croissance (Kieswetter *et al.*, 1996) et de protéines de la matrice chez les cellules ostéo-formatrices (Lincks *et al.*, 1998; Marinucci *et al.*, 2006).

Cette rugosité a aussi été montrée comme influant sur l'expression génique globale des ostéoblastes (Brett *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'organisation des anfractuosités du support de culture fait débat puisque certaines études montrent, avec la diminution d'organisation, une augmentation de la prolifération (Anselme *et al.*, 2002) et de l'adhérence (Bowers *et al.*, 1992), alors que d'autres montrent une diminution de la prolifération (Anselme *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2008) et de l'activité métabolique (Ball *et al.*, 2008). Ces différences reflètent le fait que les conditions de culture et de surface ne sont jamais parfaitement les mêmes entre les études (Bachle et Kohal, 2004).

La rigidité du support est aussi susceptible d'influer sur le comportement ostéoblastique. La vitesse de migration, la prolifération, et la différenciation augmentent en effet avec la rigidité du support de culture, les supports les plus mous laissant apparaître un cytosquelette d'actine peu organisé, à l'inverse des supports rigides (Khatiwala *et al.*, 2006). Il a été montré par la même équipe que l'effet différenciant de la dureté du support de culture passait par la phosphorylation d'un membre de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Khatiwala *et al.*, 2007), famille de protéines connues pour leur rôle régulateur dans la différenciation ostéoblastique (Jaiswal *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2000).

Ce mécanisme est sous la dépendance de petites protéines de la famille des GTPases, appelées RhoA (Khatiwala *et al.*, 2009), impliquées dans la réponse à l'environnement mécanique (Putnam *et al.*, 2003). Ces observations concernant la rigidité du support de culture amènent à la notion de durotaxie (ou mécanotaxie), notion qui n'est pas restreinte aux ostéoblastes (Engler *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 2000; Pelham et Wang, 1997). Cependant, les effets de la rigidité du support de culture dépendent aussi de la qualité de la matrice qui peut y être déposée. En effet, la migration, par exemple, devient biphasique lorsque les supports sont

recouverts par une haute densité de collagène de type I, puisque faible pour les supports les plus rigides et les plus mous, et élevée pour les supports intermédiaires, laissant présager d'une intégration mécano-chimique au niveau cellulaire (Khatiwala *et al.*, 2006).

Une autre notion à prendre en compte est l'énergie de surface (mesurée par l'angle de contact d'un liquide et ainsi directement liée à la mouillabilité). Celle-ci augmente avec l'hydrophilie du matériau. Il a été montré que l'adhérence des ostéoblastes augmente avec l'énergie de surface du matériau (Keselowsky *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2010). On peut aussi noter l'effet de la dimensionnalité du micro-environnement, la tridimensionnalité se rapprochant plus des tissus natifs que les boîtes de culture bidimensionnelles (Pampaloni *et al.*, 2007). La morphologie des ostéoblastes est en effet hautement affectée lorsqu'ils sont cultivés en trois dimensions. Ils émettront de longs prolongements cytoplasmiques dans le dernier cas, les faisant ressembler à des ostéocytes (Boukhechba *et al.*, 2009; Karsdal *et al.*, 2002; Murshid *et al.*, 2007) et changeront leurs productions géniques vers un modèle ostéocytaire, notamment en diminuant leur expression de collagène de type I (Boukhechba *et al.*, 2009). Dans le cas d'environnements tridimensionnels intervient la notion de porosité du matériau. La porosité du tissu osseux natif n'est en effet pas un élément à négliger, puisqu'elle représente 50 à 90% du volume osseux trabéculaire, et 3 à 12% du volume osseux cortical (cités dans (Karageorgiou and Kaplan, 2005)). La porosité des matériaux implantés est en effet nécessaire à la synthèse de tissu osseux néoformé (Kuboki *et al.*, 1998). *In vivo*, ce sont les porosités élevées qui permettent l'ostéogénèse (Kruyt *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2003). *In vitro*, une faible porosité permettrait la différenciation alors qu'une forte porosité permettrait une meilleure prolifération, facilitant le transport de l'oxygène et des nutriments (Takahashi et Tabata, 2004).

Ainsi, la MEC, en plus d'être un support structural, fournit de nombreux signaux mécaniques à la cellule adhérente, régulant la prolifération, la différenciation, la morphologie et l'apoptose cellulaire (Vogel et Sheetz, 2006).

On pourrait parler de ces signaux en termes de niche mécanique (Discher *et al.*, 2009), une niche étant le micro-environnement régulant la survie et la différenciation des cellules *in vivo*.

II.3.1.b. La synthèse de la matrice extracellulaire

La principale molécule synthétisée par les ostéoblastes est le collagène de type I, protéine présente initialement sous forme de procollagène.

Ils synthétisent aussi des protéines non collagéniques, notamment de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine et secrètent également des facteurs de croissance tels que le TGF β , l'IGF, le FGF (respectivement le Transforming, l'Insulin et le Fibroblast Growth Factor).

Les molécules de collagène de type I forment des triples hélices qui s'assemblent en fibrilles via des ponts de pyridolines. Ces fibrilles s'organisent ensuite en faisceaux.

II.3.1.c. La minéralisation

La formation des cristaux d'hydroxyapatite n'est possible qu'en présence de certains niveaux de concentrations en Ca²⁺ et en PO₄⁻. L'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et l'ostéonectine de la matrice osseuse non minéralisée possèdent des sites capables de se lier au calcium qui est déposé par les ostéoblastes lors de la phase de minéralisation. L'ostéocalcine présente dans l'ostéoïde, peut également capter les ions calcium extracellulaires, dont la concentration intracellulaire locale augmente lors de la phase de minéralisation. La phosphatase alcaline, enzyme synthétisée par les ostéoblastes, est capable d'hydrolyser les esters phosphoriques (pyrophosphates ...-P-O-P-.....) qui sont des inhibiteurs de la minéralisation. Cette enzyme permet l'accumulation de Ca²⁺ et de PO₄⁻. Les ions calcium réagissent alors avec les fibres de collagène. L'ajout progressif de minéraux se fait au dépourvu de la quantité d'eau qui va donc diminuer (Toppets *et al.*, 2004). Notons que la minéralisation va déterminer la densité de l'os (le volume osseux étant lui fixé par la sécrétion d'ostéoïde).

II.3.2. Les ostéocytes

C'est une cellule osseuse issue de la différenciation des ostéoblastes, elle est métaboliquement peu active. De forme étoilée, elle est aplatie, fusiforme et possède un noyau central condensé. Cette cellule est contenue dans une logette minéralisée appelée ostéoplaste et ne peut en sortir. Les ostéocytes : Certains ostéoblastes, qui ne meurent pas par apoptose, se transforment en ostéocytes. Ces cellules sont incluses dans la matrice osseuse.

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os. L'ostéocyte possède de nombreux prolongements cytoplasmiques qui s'étendent à l'extérieur de l'ostéoplaste permettant d'être connectés à d'autres ostéocytes, à des ostéoblastes et aux cellules bordantes.

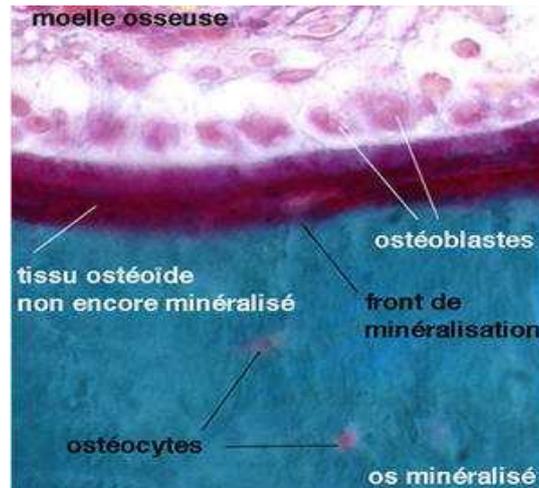


Figure 15 : L'ostéoblaste produit la matrice ostéoïde puis la minéralise
(<http://dossier.univ-st-etienne.fr/lbto/www/tissu-osseux/index.html> Dr Lafage-Proust)

Ces connexions via les prolongements cytoplasmiques se nomment des GAP-JUNCTIONS, elles permettent de véhiculer un message chimique (ions calcium surtout et des hormones) mais aussi un message mécanique (mouvements liquidiens, gravité et déformations), (Ham Aw ; 1952).

II.3.3. Les ostéoclastes

Ils proviennent de cellules souches hématopoïétiques, c'est-à-dire qu'ils sont issus de la fusion de deux monocytes qui deviennent des macrophages. Les ostéoclastes : Ils proviennent de cellules hématopoïétiques. Ce sont des cellules multinucléées géantes capables de détruire de grandes quantités de matrice extracellulaire osseuse et d'en dissoudre la partie minérale.

Ce sont des cellules géantes plurinucléées, spécialisées dans l'élimination des tissus calcifiés, on les retrouve au niveau des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship.

Les ostéoclastes ont une réaction positive à la phosphatase alcaline. La cellule présente une surface où la membrane cellulaire est plissée, elle forme des invaginations. Au niveau de ces digitations cytoplasmiques des protons sont libérés au niveau de la zone minéralisée à éliminer.

Cette libération de protons a pour conséquence d'acidifier le milieu afin de dissoudre les tissus durs, laissant la phase organique libre qui sera par la suite éliminée par des enzymes lysosomiales et des collagenases (Vaes G, 1988).

II. 4. La réparation physiologique du tissu osseux

La formation osseuse ou ostéogénèse se produit lors de la consolidation osseuse au cours du remaniement ou lors de la réparation du tissu osseux après une lésion. La formation osseuse peut s'effectuer de deux manières différentes, soit par un processus d'ossification endochondrale (à partir de tissu cartilagineux préexistant) soit par un processus d'ossification intramembranaire (à partir d'une membrane fibreuse).

III. 4.1. Les chondrocytes, cellules du modelage

Les chondrocytes proviennent, comme les ostéoblastes, des cellules souches mésenchymateuses. Le chondrocyte, unique type cellulaire du cartilage hyalin, est une cellule spécialisée et hautement différenciée. Généralement de forme sphérique ou ovoïde, sa taille atteint 30 à 40 µm de diamètre. Le chondrocyte est séparé de sa matrice extracellulaire par un *espace péri-cellulaire*. Dans cette logette, un grand nombre de molécules d'attache membranaire (collagène de type VI, protéines d'adhésion, héparanes sulfates) relie la cellule à sa matrice environnante, l'ensemble portant le nom de *chondron* ou *chondroplaste* (Poole ; 1992).

Les chondrocytes occupent 10 % du volume cartilagineux total (1 à 10 % du volume sec), mais leur nombre, leur taille et leur forme ainsi que leur activité métabolique varient considérablement selon le type d'articulation, la localisation topographique et surtout l'âge de l'individu. En effet, la densité cellulaire tant à décroître avec l'âge.

En raison du caractère avasculaire du cartilage, le chondrocyte utilise essentiellement le glucose et privilégie la voie de la glycolyse anaérobie. Il s'agit d'un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. En effet, il existe un gradient hypoxique qui varie de 10 % de teneur en oxygène en surface à 1 % en profondeur. Cependant, les chondrocytes des couches les plus superficielles peuvent utiliser partiellement un fonctionnement aérobie par diffusion de l'oxygène présent dans le liquide synovial. Les chondrocytes ne migrent pas et se multiplient peu ou pas dans un cartilage sain.

On les trouve généralement lors de la formation de cartilages et lors de l'ossification enchondrale. Les chondrocytes sont sensibles à la fréquence et à l'amplitude de chargement (Wu et Herzog ; 2006).

Une contrainte mécanique excessive et répétée peut causer leur mort ou leur endommagement morphologique et/ou cellulaire. Les interactions matrice-cellules, les flux de fluide environnant, les états de contraintes-déformations ont un rôle majeur dans la mécano-

transduction des chondrocytes et sont des stimuli associés au remodelage, à l'adaptation et à la dégénération de cartilage articulaire.

II. 4. 2. L'ossification enchondrale

La réparation enchondrale est réalisée suite au recrutement de CSM issues de la couche interne du périoste et de la moelle osseuse. Les CSM prolifèrent, se différencient en chondrocytes et vont synthétiser une matrice cartilagineuse avasculaire constituée de collagène de type II, IX et XI, d'agréganes et de protéoglycanes (Mackie *et al.*, 2008).

En résulte la formation de cartilage suivi d'os tissé (os primaire) et lamellaire dans un espace inter-fragmentaire, large et mobile (Fig.A) Au niveau de la matrice cartilagineuse, les chondrocytes vont se multiplier avant de s'hypertrophier. Dans cette zone hypertrophique, les sels de calcium précipitent et forment un cartilage calcifié.

Les chondrocytes incorporés dans cette matrice calcifiée qui ne laisse plus diffuser les nutriments, dégènèrent, ne sécrètent plus d'angio-inhibiteur et finissent par mourir. Le cartilage se lyse, créant des lacunes ouvertes vers la diaphyse dans lesquelles des bourgeons vasculaires vont pénétrer, apportant des ostéoclastes qui vont accélérer le processus de dégradation du cartilage et augmenter la taille des lacunes (Fig. B).

Parallèlement, les cellules souches mésenchymateuses, elles aussi apportées par la vascularisation, vont se différencier en ostéoblastes qui vont permettre la formation d'un tissu osseux en remplacement du cartilage en destruction (Sandell et Adler ; 1999) Les ostéoblastes vont tapisser la paroi des lacunes avec des lamelles de substance osseuse au sein desquelles ils vont être emprisonnés et dériver en ostéocytes.

Ensuite, les ostéoclastes vont rapidement creuser la cavité médullaire au centre de la diaphyse, où se logera un tissu conjonctif qui deviendra la moelle jaune. Cette cavité permettra également l'invasion de vaisseaux sanguins. L'ossification endochondrale qui se produit dans le cartilage de croissance, aux extrémités des diaphyses des os longs, est à l'origine de la croissance en longueur des os (Chung *et al.*, 2004).

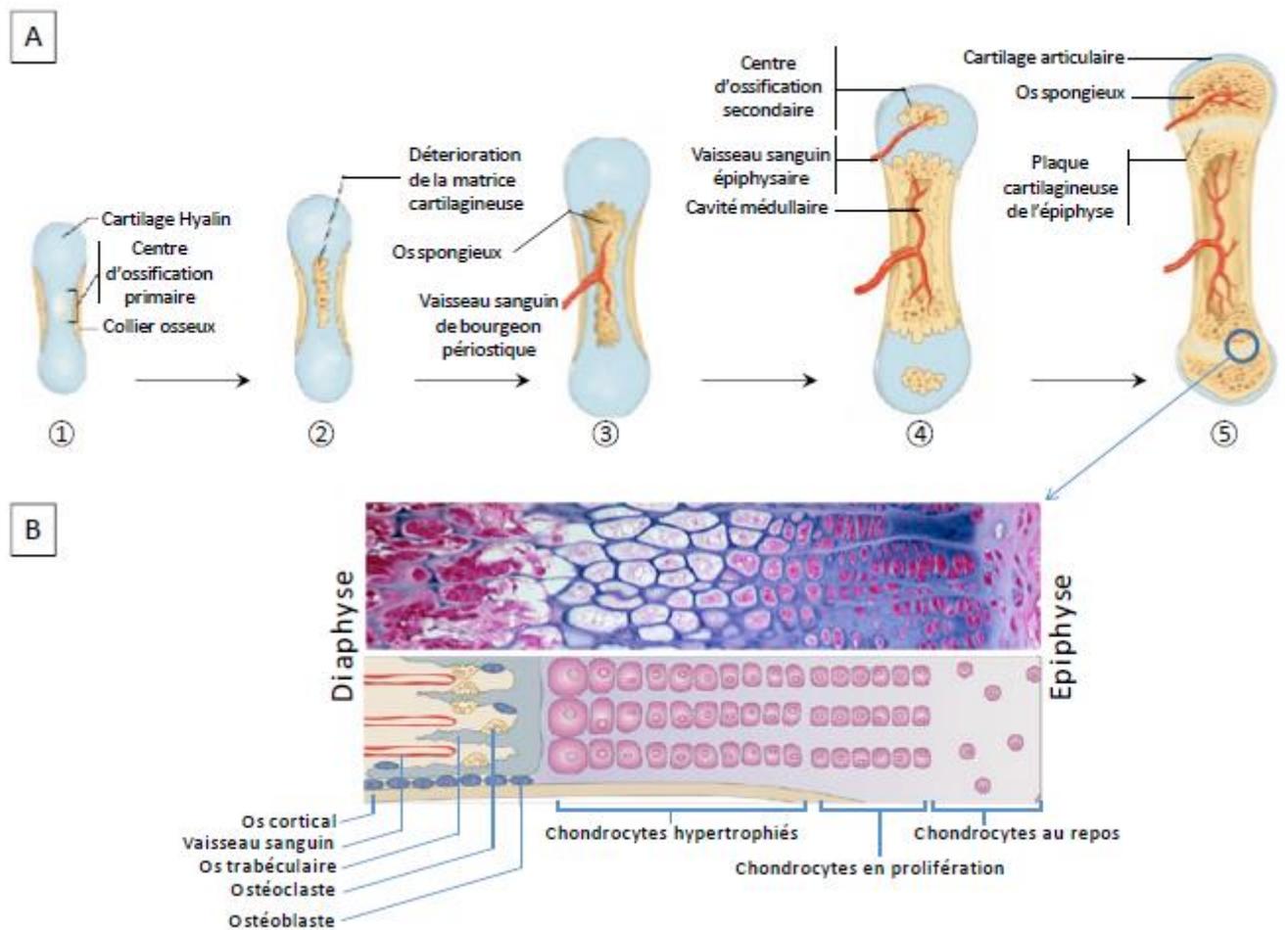


Figure 16. Processus de l'ossification endochondrale (A) adapté de <http://faculty.irsc.edu> d'après Calmar *et al.*, 2002. Image histologique et représentation schématique de la plaque de croissance (B) adapté de <http://www.bu.edu> et Page-McCaw *et al.*, 2007.

II. 4. 3. L'ossification intra-membranaire

La réparation intramembranaire ou La réparation osseuse directe (direct bone repair, gap repair) ne passe pas par une étape Intermédiaire cartilagineuse et se fait dans un environnement sans contraintes mécaniques. Les cellules ostéoprogénitrices provenant de la moelle osseuse produisent un os primaire, remodelé pour donner un os mature lamellaire.

Ce mode de réparation a lieu dans le cas de lésions d'une taille de plus de 0,1 mm, dans un environnement très stable (Perren;1979; Shapiro ; 1988).

La réparation osseuse directe fait intervenir les cellules mésenchymateuses de la couche interne du périoste, de l'endoste et de la moelle osseuse. Ces CSM vont se différencier en ostéoblastes puis produiront un os primaire qui sera secondairement remodelé en os lamellaire.

Elle est observée dans un environnement stable d'un point de vue mécanique, pour des tailles de lésions comprises entre 0.25 et 0.5 mm (Stroncek et Reichert, 2008). Ce mode de réparation ne passe pas par une étape intermédiaire de type cartilagineuse. Les cellules ostéoprogénitrices provenant de la moelle osseuse et du périoste se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes dans une zone hypervascularisée dans les 24 heures suivant la fracture. Au bout du troisième jour, ces cellules synthétisent une matrice dont les fibres collagéniques n'ont pas d'orientation spécifique et dont la minéralisation n'est pas ordonnée, ce tissu est appelé « cal dur » ou « cal osseux ». Le taux de prolifération des cellules recrutées sur le site de lésion est maximal entre le jour 7 et jour 10 et diminue à partir du quatorzième jour (Tsiridis *et al.*, 2007). La minéralisation se fait par zones disséminées de façon aléatoire, du centre vers la périphérie de la lésion. Ce type d'os est appelé « os tissé », il sera remplacé par de l'os lamellaire mature après remodelage (Dimitriou *et al.*, 2005 ; Einhorn, 1998).

II. 4. 4. La réparation osseuse primaire ou de contact direct

Cette réparation fait intervenir des ostéoclastes résorbant les zones osseuses nécrotiques de part et d'autre de la lésion. Les ostéoblastes du système Haversien produiront directement un os lamellaire parallèle à l'axe de l'os. Cette réparation se caractérise par l'absence de phase cartilagineuse et de remodelage osseux. Il se réalise dans un environnement sans espace interfragmentaire et stable (Funk-Brentano, 2010). Ce mode de réparation est proche de celui mis en place pour la réparation des micro-dommages osseux ou micro-fractures intra osseuse de quelques centaines de micromètres.

II. 5. Le cycle du remodelage osseux

Le cycle débute par la phase d'activation caractérisée par la rétractation des cellules bordantes à la surface du tissu osseux sous l'effet de facteurs inducteurs de la résorption (hormone parathyroïdienne, vitamine D3, prostaglandine E2, *etc.*) laissant l'os accessible aux pré-ostéoclastes ou ostéoclastes (Chambers *et al.*, 1985). Les ostéoblastes environnants par sécrétion de cytokines (RANKL) vont alors favoriser la différenciation et l'activation des préostéoclastes en ostéoclastes matures. Les ostéoclastes différenciés et activés vont alors adhérer à la surface osseuse puis la dégrader (phase de résorption), libérant des bone morphogenetic protein (BMPs) et d'autres facteurs de croissance enchâssés dans la matrice et susceptibles d'activer les cellules responsables de la formation osseuse (Sims et Gooi, 2008). La phase d'inversion suit la phase de résorption, correspondant au moment où la profondeur maximale d'érosion est atteinte.

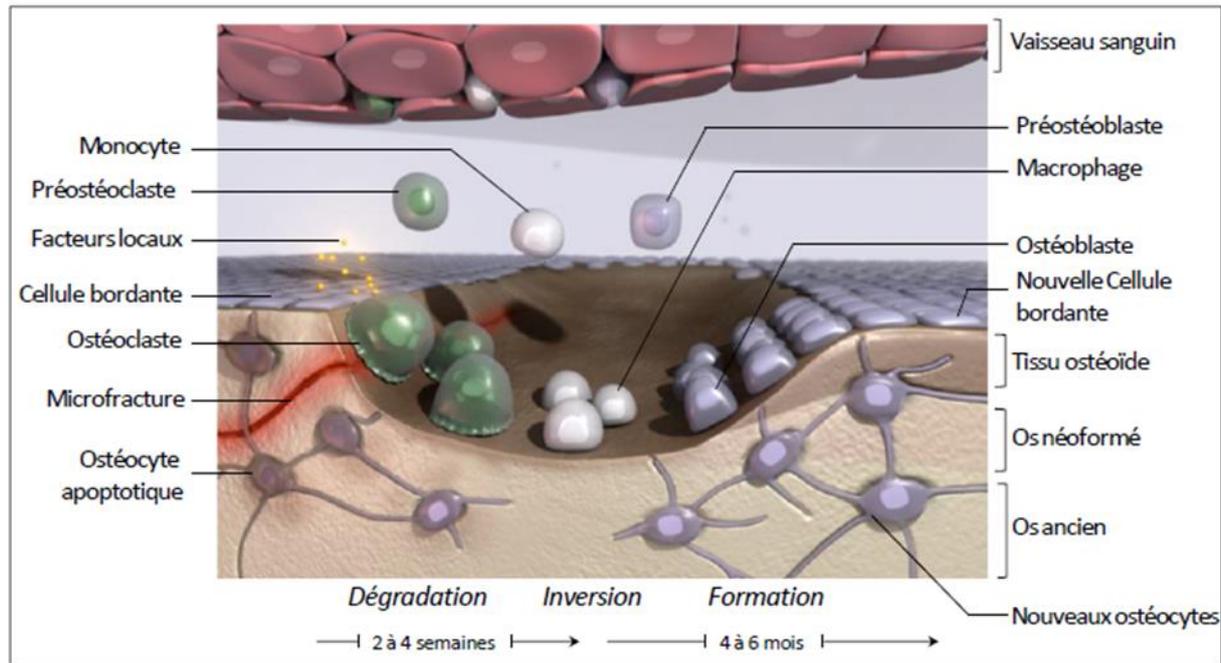


Figure 17. Remodelage du tissu osseux, adaptée de Canalis *et al.*, 2007.

Les ostéoclastes se détachent de la surface osseuse érodée et meurent par apoptose (Wu *et al.*, 2003) laissant leur place à des macrophages qui vont alors lisser le fond de la lacune et phagocyter les débris. La dernière phase du remodelage est la phase de formation d'un nouveau tissu osseux qui se déroule en deux temps. Dans un premier temps, les facteurs de croissance libérés par les ostéoclastes vont stimuler la différenciation de précurseurs ostéogéniques en ostéoblastes (Pederson *et al.*, 2008) responsables de la production de la matrice extracellulaire (Fig. 17). Cette étape sera suivie d'une étape de minéralisation de cette matrice grâce à la phosphatase alcaline (ALPL), sécrétée par les ostéoblastes, qui va permettre de concentrer localement les ions calcium et phosphate. Le tissu osseux est donc le théâtre d'une activité cellulaire importante et permanente essentielle au maintien et au remodelage de la masse osseuse.

II. 6. L'articulation et le cartilage

Les articulations forment la jonction entre les os et permettent d'assurer la mobilité relative du squelette, ainsi que le pivotement des membres (Fig.18). De plus, elles assurent le rôle de tampon qui permet d'amortir les chocs entre les os porteurs et donc, de préserver les organes. Elles sont classées selon leur structure et leur fonction en articulations, fibreuses, cartilagineuses ou synoviales (Marieb, 2005).

Le tissu cartilagineux est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques. La plupart des cartilages sont nourris par diffusion à travers la MEC à partir des capillaires du périchondre. Les cartilages articulaires sont nourris à partir du liquide synovial.

Le cartilage constitue donc la partie essentielle de l'articulation. Il recouvre les extrémités osseuses et il joue un rôle de " film protecteur " de l'articulation. Lors de la réalisation de mouvement, il remplit deux fonctions principales. Il assure d'une part, le glissement des segments osseux les uns contre les autres, en diminuant au maximum les forces de friction présentes. Le cartilage étant non innervé, il ne peut donc transmettre aucune information au cerveau, ce qui rend le mouvement imperceptible et indolore.

D'autre part, le cartilage assure la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation. Une troisième fonction, dépendante des deux premières, peut lui être attribuée : celle d'assurer sa propre trophicité. Le cartilage est effectivement —nourri” par le liquide synovial, lui-même sécrété par la membrane synoviale

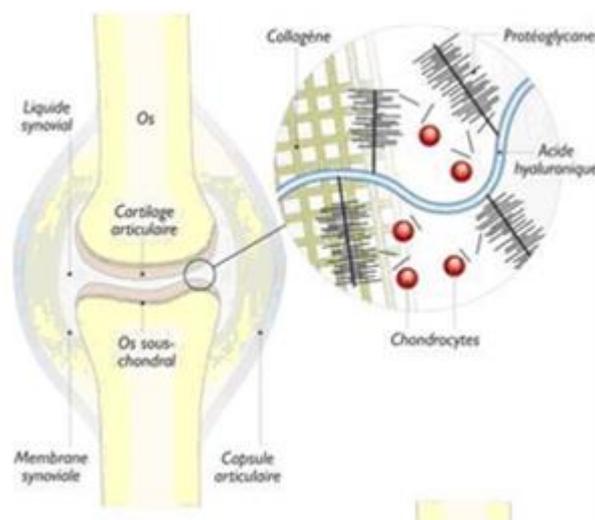


Figure 18. Structure du cartilage articulaire sain

(<http://www.labrha.com/glucosamine-place-dans-le-cartilage-articulaire.aspx>)

L'articulation est tapissée de cartilage articulaire lisse qui est essentiel pour les mouvements de frottement et d'absorption des chocs (Fig.18). La détérioration de celui-ci est appelée « défaut ostéo-chondral » si le traumatisme ou la maladie se réfère à un os chondral ou sous-jacent (Vijayan *et al.*, 2010).

Le cartilage articulaire, comme l'os, se remanie en permanence. C'est un tissu blanc, brillant, légèrement translucide.

Histologiquement, il s'agit d'un tissu conjonctif non vasculaire et non innervé composé d'une matrice extracellulaire et d'un seul type cellulaire : les chondrocytes qui ne représentent que 3 % du poids total du cartilage. La matrice extracellulaire est essentiellement formée d'eau (de 70 à 80 %) et de 20 à 30 % d'un réseau de fibres de collagènes rigides principalement de type II au sein duquel sont emprisonnées des molécules très hydrophiles : les protéoglycanes dont l'agrécane (Laadhar *et al.*, 2007).

Chez l'homme, trois types de cartilage sont présents. Ils ont des localisations, des compositions et des fonctions différentes (Tab.I) : le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux. Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin.

Tableau I. Comparaison des constitutions des trois cartilages.

Cartilage	Composition de la MEC	Localisation
Hyalin	- collagène de type II (majoritaire), IX et XI - microfibrilles de collagène peu abondantes, de petit calibre, non visibles en microscopie optique (MO) d'où l'aspect amorphe et homogène de la MEC	nez, bronches, trachée, côtes, articulations
Elastique	- en plus du collagène de type II, présence de nombreuses fibres élastiques	trompe d'Eustache, pavillon de l'oreille externe épiglotte, certains cartilages laryngés
Fibreux	- épais faisceaux de fibres de collagène de type I	disques intervertébraux, symphyse pubienne, ménisque du genou, insertion du tendon d'Achille

II. 7. Les pathologies de l'os et du cartilage

Tous les pays industrialisés font face à une augmentation progressive de l'espérance de vie en raison du recul de la mortalité. Par conséquent, la prévalence des maladies chroniques liées à l'âge a augmenté. Ces complications métaboliques sont associées à des dysfonctionnements de l'appareil locomoteur.

Parmi ces maladies, la sarcopénie et l'ostéoporose sont particulièrement invalidantes et représentent un enjeu social et économique à travers le monde (Wauquier *et al.*, 2011) L'ostéoporose est caractérisée par une fragilité osseuse excessive qui conduit à un risque accru de fractures. Les traitements d'aujourd'hui tels que le traitement hormonal substitutif (THS) ont démontré des avantages évidents sur les femmes ostéoporotiques post-ménopausées (Ozgoçmen *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2007).

Selon (Bonnick ; 2006) l'ostéoporose fait partie des plus connues car elle représente la maladie osseuse liée au vieillissement la plus fréquente. Mis à part quelques cas observés chez l'homme, cette maladie est majoritairement féminine. Elle se caractérise par une perte de masse osseuse et une altération architecturale du tissu osseux aboutissant à une fragilisation du squelette dans son ensemble et donc à une probabilité de fracture accrue (Labovitz ; 2007). Certaines pathologies, certes plus rares, n'en sont pas moins très handicapantes pour les patients et nécessitent une prise en charge importante. Les maladies génétiques rares à caractère autosomique dominant sont caractérisées dans 90 % des cas par une anomalie de production du collagène de type I au niveau quantitatif ou qualitatif. Ces maladies osseuses, comme l'ostéogénèse imparfaite (ou maladie des os de verre), induisent une fragilisation de l'os qui entraîne des fractures spontanées à répétition associées dans les formes les plus graves à d'importantes déformations.

Concernant l'ostéogénèse imparfaite, une étude de Horwitz *et al.* en 1999 a montré que l'implantation de moelle osseuse allogénique permettait la formation d'un nouveau tissu osseux dense et la diminution de la fréquence des fractures.

La régulation de l'ostéogénèse est déterminée par des facteurs génétiques (taille et forme des os), par les forces mécaniques environnantes (variations structurelles et des propriétés) et aussi par des facteurs nutritionnels et hormonaux. L'alimentation doit apporter des acides aminés, de la vitamine C, du calcium, de la vitamine D, A et K.

-En ce qui concerne les hormones, en voici quelques-unes impliquées dans la formation et la longévité de l'os :

-Les hormones de croissance stimulent et activent les chondrocytes, les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes. La vitamine D favorise la minéralisation du tissu osseux. Elle stimule également l'ostéoclasie (résorption du tissu par les ostéoclastes).

-La parathormone (PTH) induit l'activation des ostéoclastes via les ostéoblastes, stimule l'ostéolyse par les ostéocytes, augmente la synthèse de l'hormone découlant de la transformation de la vitamine D.

-La calcitonine diminue l'activité des ostéoclastes et des ostéocytes (en ce qui concerne l'ostéolyse), stimule à court terme l'activité des ostéoblastes et favorise le stockage de calcium dans l'os. L'ostéocalcine est une protéine synthétisée par les ostéoblastes (synthèse vitamine K dépendante) : elle est sécrétée dans l'os et dans le sang et n'est pas relarguée par les ostéoclastes dans la matrice lors de la résorption osseuse.

-Les œstrogènes et stéroïdes sexuels contrôlent le début des ossifications endo-chondrales.

Les tumeurs osseuses malignes représentent une pathologie en recrudescence dans le nord d'Afrique en raison de leur dépistage à un stade plus ou moins précoce. Afin d'augmenter leur chance de guérison.

Les sarcomes osseux les plus fréquents regroupent l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome. Elles peuvent toucher l'enfant aussi bien que l'adulte. Chez l'enfant, les tumeurs osseuses malignes ne représentent que 15% de l'ensemble des tumeurs osseuses, avec à leur tête l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing et c'est presque la même proportion qu'on trouve chez l'adulte. Donc 85% des tumeurs osseuses sont des tumeurs bénignes (Mahfoud ; 2009).

Chez l'adulte, les principales causes de tumeur osseuse maligne sont d'abord les métastases osseuses de tumeurs solides, puis, plus rarement, les myélomes, et encore plus rarement, les tumeurs osseuses primitives (Goldwasser *et al.*, 2007).

Les articulations sont sujettes à de nombreuses pathologies dont l'arthrose, l'arthrite et les arthropathies microcristallines. L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage articulaire dont la prévalence, quelle que soit sa localisation, augmente fortement avec l'âge, et atteint environ 80 % des patients âgés de plus de 75 ans.

Les articulations affectées sont principalement celles de la main, du rachis cervico-lombaire, la hanche et le genou (Richette, 2008). Dans cette pathologie, le cartilage est détruit plus vite qu'il n'est reconstruit (Reboul *et al.*, 2004), se déshydrate, s'amincit, se fissure tout d'abord en surface puis en profondeur. Sa détérioration a des conséquences sur l'ensemble de l'articulation. D'une part, l'os se condense aux extrémités et parfois des excroissances osseuses (ostéophytes) apparaissent en bordure de l'articulation et la déforment.

D'autre part, des débris du cartilage abîmé se retrouvent dans la cavité synoviale et entraînent une inflammation : la synovite. La membrane synoviale agressée, libère des substances qui provoquent de nouvelles lésions cartilagineuses. La prise en charge de cette maladie à évolution lente, comprend des traitements médicamenteux et la chirurgie. Parmi les médicaments il y a les antalgiques, seuls ou associés à des anti-arthrosiques d'action lentes, des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Pour les stades un peu plus avancés, des corticoïdes en infiltration intra-articulaire sont indiqués. Enfin, dans les situations extrêmes, le remplacement de l'articulation par une prothèse.

Les arthropathies microcristallines sont des affections rhumatologiques se caractérisant par des dépôts de microcristaux au sein des articulations et des tissus périarticulaires. Ces affections se manifestent par des crises inflammatoires localisées très aiguës et particulièrement destructrices pour le tissu cartilagineux. L'arthrite correspond à l'atteinte d'une articulation par un processus infectieux (une bactérie), inflammatoire (un rhumatisme) ou micro-cristallin (goutte, chondrocalcinose).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de développements, métaboliques et traumatiques. L'arthrose affecte non seulement le cartilage et l'os, mais aussi l'ensemble des tissus de l'articulation et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques conduisant à un ramollissement (chondromalacie), une fissuration, une ulcération et une perte de cartilage, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de géodes sous-chondrales. Lorsque l'arthrose devient symptomatique, elle entraîne douleur et raideur articulaires, ainsi qu'un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale. Il faut bien souligner que les influences mécaniques sont souvent à l'origine du développement de pathologies du cartilage (Hayes *et al.*, 2001). Les lésions du cartilage se produisent quand la contrainte appliquée excède la capacité d'absorption de charge du tissu (Cornwall, 1984). Tout d'abord, un dommage mécanique peut se produire dès qu'une articulation se déplace au-delà de sa possibilité habituelle de mouvement, induisant un effort sur les parties plus molles du cartilage qui ne peuvent pas supporter la contrainte, et endommagent ainsi le réseau de collagène. (Andersson *et al.*, 1989).

Par ailleurs, il peut également avoir lieu de manière chronique lors d'exercices sportifs physiques intenses et répétés.

Dans ce cas, les articulations sont répétitivement exposées à des contraintes de niveaux élevés, et les dommages sont associés à une fissure de fatigue (Kujala *et al.*, 1995).

II.8. Modélisation *in vitro* des étapes de la différenciation osseuse

II.8. 1. Choix des cellules

Il existe deux types de lignées de cellules osseuses : d'une part, la lignée ostéoblastique comprenant les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes et d'autre part, la lignée ostéoclastique qui comprend les préostéoclastes et les ostéoclastes. Notre but étant d'étudier l'activité ostéogénique des extraits, nous avons choisi la lignée préostéoblastique. Il s'agira alors de démontrer que ces extraits induisent non seulement la différenciation des cellules de la lignée osseuse mais également qu'ils conduisent ces cellules jusqu'à la phase de minéralisation. D'autre part les chondrocytes proviennent, comme les ostéoblastes, des cellules souches mésenchymateuses. Le chondrocyte, unique type cellulaire du cartilage hyalin, est une cellule spécialisée et hautement différenciée. On les trouve généralement lors de la formation de cartilages et lors de l'ossification enchondrale.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi deux types cellulaires représentatifs de stades de différenciation, des cellules de cette lignée : les préostéoblastes MC3T3. Ces cellules correspondent à un stade de différenciation croissant. Et une lignée chondrocytaire de souris est utilisée, la lignée ATDC5, reproduisent le processus d'ossification endochondrale.

II.8. 2. Les pré-ostéoblastes

Les pré-ostéoblastes sont des cellules allongées situées au contact des ostéoblastes matures. La fonction de ces ostéoblastes matures est de synthétiser la matrice osseuse collagénique notamment le collagène type I et de participer à la minéralisation de celle-ci. Leur membrane est riche en une enzyme: la phosphatase alcaline. Cette enzyme passe dans le sang circulant et peut être dosée : elle est un marqueur du phénotype ostéoblastique. Quand les ostéoblastes deviennent matures, ils sécrètent des protéines (ostéocalcine, sialoprotéine de l'os) qui régulent le dépôt du minéral (Lian *et al.*, 1999). Les ostéoblastes reposent alors sur une couche de tissu non encore minéralisé appelé tissu ostéoïde et constitué de collagène, de protéines non collagéniques (Boskey, 1989) et de glycosaminoglycanes. Ce tissu sera minéralisé dans un second temps.

II.8. 2. 1. Les marqueurs de la différenciation ostéoblastique

Les connaissances actuelles sur le développement osseux ont été acquises au cours des quatre dernières décennies, grâce à l'identification et à la caractérisation des protéines sécrétées par les ostéoblastes et des protéines associées à la MEC de l'os. La matrice extracellulaire occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). Les principales classes de macromolécules qui composent la matrice organique forment la *substance fibrillaire* (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine), ainsi que la *substance interfibrillaire* (10 %) englobant les glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes, de petites protéines non collagéniques ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation.

D'après Nefussi *et al.* (1985, 1989, 1993), il existe quatre étapes pour parvenir à l'étape de minéralisation :

- 1) Une phase de prolifération cellulaire
- 2) Une phase de différenciation cellulaire
- 3) La formation et maturation de la MEC
- 4) L'étape de minéralisation et formation d'une surface osseuse active avec maturation des ostéocytes.

Ces différentes étapes ont par ailleurs été confirmées par Stein *et al.* (1990), Owen *et al.* (1990) et Lian and Stein (1995) qui détaillèrent la séquence de l'expression temporelle des gènes des protéines associées à la MEC et de celles sécrétées par les ostéoblastes (Fig.19).

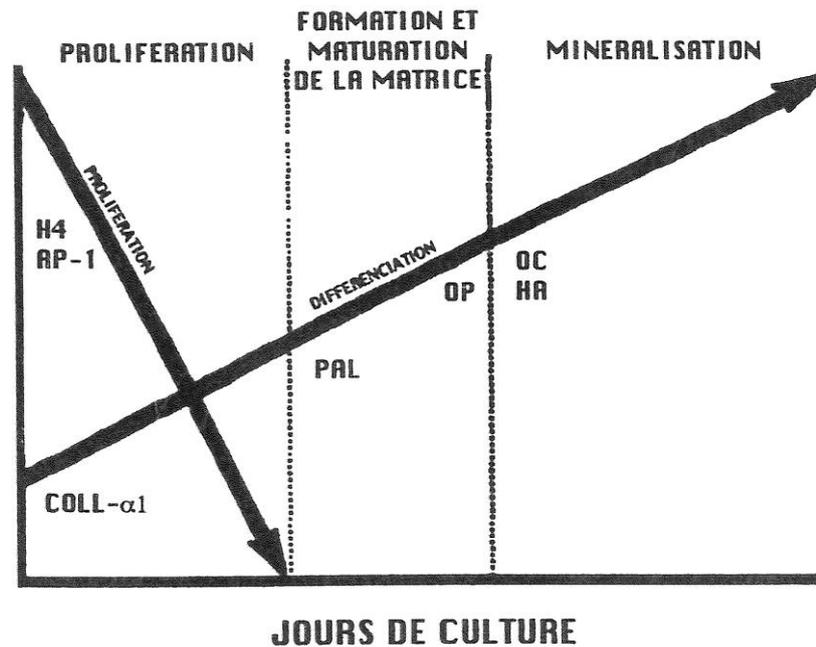


Figure 19. Relation couplée et réciproque entre la prolifération cellulaire et l'expression des gènes de la différenciation (Stein et Lian, 1993). Coll : collagène ; PAL : activité phosphatase alcaline ; OP : ostéopontine ; OC : ostéocalcine.

On y distingue nettement 3 phases qui confirment les étapes du développement ostéoblastique de Nefussi *et al.* (1997):

- 1) Une phase de prolifération durant laquelle a lieu la synthèse de la MEC et la sécrétion de collagène type I.
- 2) Une phase de maturation et d'organisation de la MEC : dès la fin de la phase de prolifération, les protéines associées au phénotype osseux sont détectées. La MEC subit alors des modifications de composition et d'organisation qui la rendent compétente pour la minéralisation : le taux de collagène commence à baisser tandis que l'activité PAL augmente.
- 3) La phase de minéralisation proprement dite où les gènes de l'ostéocalcine, de la sialoprotéine de l'os et de l'ostéopontine sont exprimés.

Les protéines exprimées vont alors constituer des marqueurs spécifiques des différentes étapes du développement osseux. Ceci permet d'identifier les diverses étapes lors de modélisations *in vitro*.

II.8. 2. 2. Collagène de type I

Le constituant essentiel de la matrice osseuse est le collagène de type 1 qui représente un peu moins de 90 % des macromolécules de la matrice organique. Appelé aussi collagène fibrillaire, il est formé de l'assemblage de trois chaînes alpha (α) de polypeptides. Les chaînes polypeptidiques sont synthétisées au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) de l'ostéoblaste. Elles subissent ensuite des hydroxylations et des glycosylations avant de s'associer en hélices de 3 pro-chaînes α . Lors de la phase de prolifération, les gènes associés au collagène type I sont fortement exprimés puis leur expression diminue progressivement et reste à un taux bas au cours des phases suivantes de la différenciation ostéoblastique. C'est par ailleurs cette accumulation de collagène qui contribue à réprimer la phase de prolifération (Lian et Stein, 1995). La synthèse d'une matrice de collagène est nécessaire pour induire l'expression des marqueurs de la différenciation terminale ; ceci explique pourquoi l'acide ascorbique est un cofacteur indispensable pour la différenciation ostéoblastique (Franceschi, 1992 ; Franceschi et Iyer, 1992 ; Franceschi *et al.*, 1994).

La matrice osseuse contient également des protéines non collagéniques synthétisées par les cellules ostéogéniques. Le rôle des protéines matricielles non collagéniques sur la réparation tissulaire a été étudié chez la souris grâce à des modèles de génétique expérimentale (Alford et Hankenson, 2006). Dans ces modèles, parmi les protéines non collagéniques l'ostéopontine et l'ostéocalcine

II.8. 2. 3. Ostéocalcine

L'ostéocalcine est la protéine non collagénique la plus abondante dans le tissu osseux. Elle fait partie de la famille des Gla protéines. Ce sont des protéines contenant des résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (Gla), résultant d'une modification post-traductionnelle des résidus glutamate. Elles jouent un rôle important dans la minéralisation, due à la haute affinité du résidu « Gla » pour le calcium. Elle est fortement exprimée par les ostéoblastes en différenciation terminale dont elle constitue le marqueur phénotypique le plus spécifique. Une fois sécrétée par l'ostéoblaste, l'ostéocalcine est incorporée dans la matrice osseuse

L'ostéocalcine est une protéine de 5.7KDa qui est dépendante de la vitamine K. Elle est riche en acide γ -carboxyglutamique (également appelée Bone Gla-protéine) et se lie aux cristaux de calcium de la phase minérale.

L'ostéocalcine est considérée comme jouant un rôle clé dans les étapes de différenciation et l'activité des cellules osseuses ainsi que sur leur maturation et la minéralisation de la matrice. Elle s'exprime au-delà du 9ème jour Elle est, par ailleurs, exprimée uniquement par les ostéoblastes différenciés (Kasugai *et al.*, 1991) lors de la phase de minéralisation (Owen *et al.*, 1990).(Fig.19)

II.8. 2. 4. Ostéopontine

L'ostéopontine fait partie de la famille des SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*). Ces protéines ne sont pas spécifiques du tissu osseux mais elles contrôlent l'activité des cellules ostéogéniques. Dans l'os, les données de la littérature suggèrent des fonctions situées à l'interface entre les cellules et le minéral (Malaval *et al.*, 2009).

L'ostéopontine a été décrite pour la première fois par Senger comme une protéine sécrétée de 60 KDa (Senger *et al.*, 1979). Initialement découverte conjointement avec la BSP, l'OPN (également nommé BSP1) tire son nom de son potentiel à faire le lien entre les cellules et la phase minérale de la matrice osseuse grâce au motif RGD et à la séquence riche en acide aspartique découvert dans la séquence primaire de la protéine (Oldberg *et al.*, 1986). OPN fut également identifiée comme une lymphokine potentielle, produite par les lymphocytes activés et les macrophages sous le nom de Eta-1 (early T-lymphocyte activation gene 1) (Patarca *et al.*, 1989). Un motif d'expression plus large de la protéine a alors émergé. L'OPN fut alors nommée Secreted Phosphoprotein 1 (SSP1) reflétant la diversité de fonction de la protéine. Néanmoins, le nom d'ostéopontine a largement été retenu et gardé pour la nomenclature du gène humain (Denhardt *et al.*, 1995).

L'OPN joue également un rôle dans le contrôle de l'activité ostéoclastique. Ainsi, elle intervient dans l'ostéoclastogénèse (Aitken *et al.*, 2004 ; Yamate *et al.*, 1997), dans le recrutement et la migration des ostéoclastes (Chellaiah *et al.*, 2003) ainsi que dans le contrôle de leurs activités (Contractor *et al.*, 2005).

L'ostéopontine est synthétisée dès le 7ème jour, localisée à l'interface entre le tissu mou et os primaire pendant le processus de transition entre le cal cartilagineux et le cal osseux.

Dans tous les cas, l'absence d'ostéopontine diminue la vascularisation et la régression du cal cicatriciel formé lors d'une fracture, ainsi que le remodelage osseux conduisant à un retard de réparation (Duvall *et al.*, 2007) (Fig.20). Ainsi, l'OPN intervient dans les processus élémentaires tels que l'angiogenèse, la migration et l'attachement cellulaire, les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, la minéralisation, le remodelage tissulaire. Ces processus sont également à la base de la réparation osseuse (Carano *et al.*, 2003).

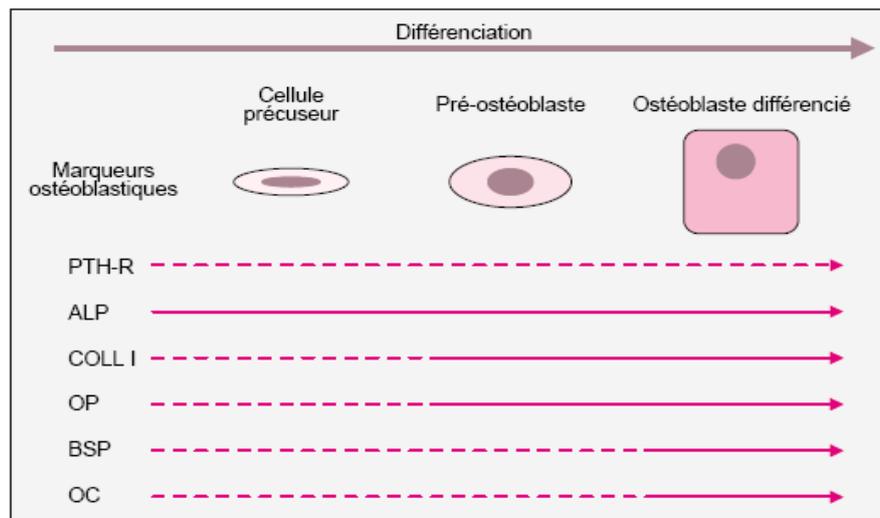


Figure. 20 Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques précoces

(PTH-R : récepteur de la PTH; ALP : phosphatase alcaline ; COLL-I : collagène de type I ; OP : ostéopontine) ou tardifs (BSP : sialoprotéine osseuse ; OC ; ostéocalcine) (--- : faible expression ; — : forte expression). (Pierre, 2001).

Aussi parmi Les principaux facteurs de transcriptions contrôlant la différenciation ostéoblastique sont Runx2.

II.8.2.5. Runx2 aussi dénommé Cbfa1, est un membre de la famille des facteurs de transcription Runx. Il a été identifié comme un élément majeur de la différenciation ostéoblastique. Il est exprimé par les cellules mésenchymateuses au stade précoce de la formation du squelette et est exprimé par les ostéoblastes tout au long de leur différenciation (Karsenty, 2000). La transfection de Runx2 dans des fibroblastes induit l'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes comme l'ostéocalcine, les bone sialoprotéines ou le collagène de type I (Kern *et al.*, 2001).

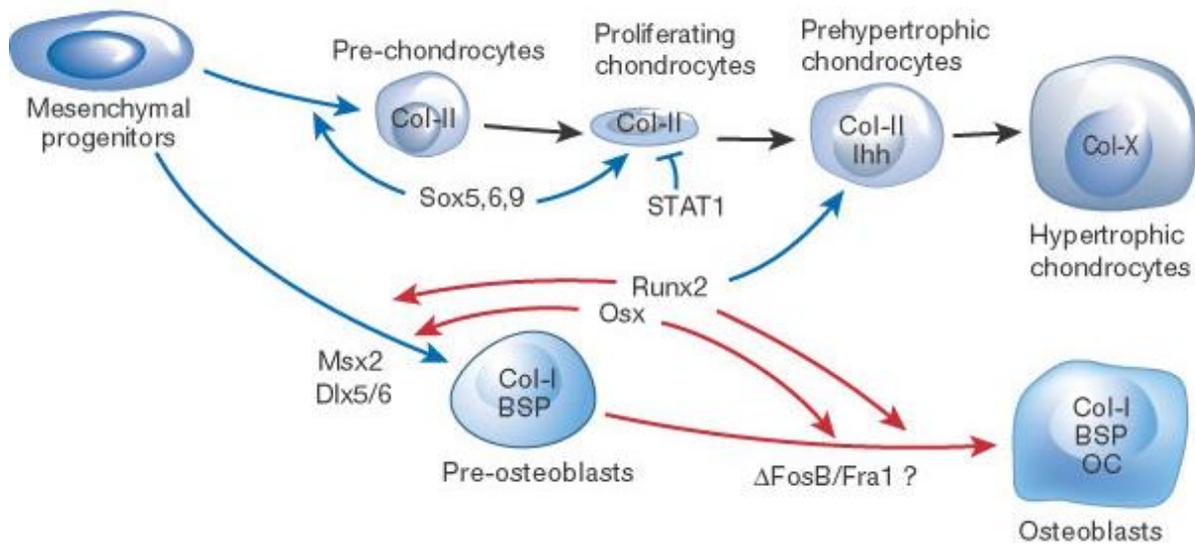


Figure. 21 Contrôle de la transcription des osteoblastes.

D'après (Harada et Rodan, 2003).

Abréviations: STAT1, signal transducers and activators of transcription 1; Runx2, runt-related transcription factor 2; Col I/ II/X, type I/II/X collagène; Ihh, Indian hedgehog; BSP, bone sialoprotéine; OC, ostéocalcine.

II.8.2.6. Runx2 dans l'ostéogenèse et la chondrogenèse

Runx2 (appelé aussi Cbfa1) (Fig.21), est le plus spécifique des marqueurs moléculaires de la lignée des ostéoblastes. Son expression est à la fois nécessaire et suffisante pour induire l'ostéogenèse et il régule l'expression des gènes de la plupart des caractéristiques phénotypiques des ostéocytes. Plusieurs études indiquent le rôle essentiel de Runx2 dans la formation de l'os et dans l'ostéoblastogenèse. Komori *et al.* et Otto *et al.* ont constaté que les souris de Runx2-null n'ont pas d'os, ni d'ostéoblastes (Komori T *et al.*, 1997; Otto F *et al.*, 1997). Mundlos *et al.* identifient que Runx2 est un gène responsable de la dysplasie cleidocranial (CCD) (Mundlos S *et al.*, 1997). D'ailleurs, Ducy *et al.* ont prouvé que Runx2 se lie à l'ADN-liant élément d'ostéoblaste-spécifique dans la région du promoteur du gène de l'ostéocalcine et règle ainsi la transcription de l'ostéocalcine, de l'ostéopontine, et des sialoprotéines de l'os (Ducy P *et al.*, 1997).

De nombreuses études démontrent que Runx2 et Runx3 sont essentiels pour la différenciation chondrocytaire à l'étape hypertrophique (Enomoto H *et al.*, 2000 ; Yoshida CA *et al.*, 2002 ; Ueta C *et al.*, 2001 ; Yoshida CA *et al.*, 2004).

En outre, il semble que Runx2 et Runx3 règlent la chondrogenèse par Ihh, car il n'y a pas d'expression de Ihh chez les souris de double-coupe de Runx2 et Runx3 (Yoshida CA *et al.*, 2004).

De plus, Smad1 et Smad5 peuvent interagir avec Runx2 et améliorer son activité transcriptionnelle et ostéoblastique (Hanai J *et al.*, 1999 ; Zhang YW *et al.*, 2000 ; Nishimura R *et al.*, 2002) ; C/EBP β et C/EBP δ s'associent avec Runx2, puis améliorent l'activité du promoteur de l'ostéocalcine (Gutierrez S *et al.*, 2002). Par ailleurs, C/EBP β promeut la différenciation ostéoblastique en s'associant avec Runx2 (Hata K *et al.*, 2002), bien que la famille de C/EBP joue un essentiel rôle dans la différenciation des CSMs en adipocytes ; ATF4, un facteur transcriptionnel de la famille de CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*), règle le promoteur du gène d'ostéocalcine en collaboration avec Runx2 (Bialek P *et al.*, 2004).

II.8. 3. Les chondrocytes

Le cartilage hyalin contient un seul type cellulaire : les chondrocytes. Il s'agit de cellules arrondies de 30 à 40 μm de diamètre isolées les unes des autres par la matrice extracellulaire. Ils occupent en moyenne 10% du volume total du cartilage. Les chondrocytes ont un noyau central. Ils ne migrent pas et ne se divisent pas ou peu dans le cartilage articulaire. Ils fonctionnent principalement en anaérobie, excepté les chondrocytes de la couche superficielle qui peuvent bénéficier de la diffusion de l'oxygène par le liquide synovial. La couche superficielle est la plus riche en chondrocytes. Les chondrocytes maintiennent un équilibre entre synthèse et dégradation des protéines structurales de la matrice extracellulaire (Poole ; 1992).

II.8. 3.1. La différenciation chondrocytaire et ses marqueurs au cours de l'ossification endochondrale

Cette différenciation se caractérise par la formation d'une matrice contenant différents types de collagènes tels que les collagènes de type II, IX et XI mais aussi des agrécannes. Le facteur de transcription Sox9 est un des premiers facteurs permettant aux cellules de commencer l'étape de condensation (Fig. 22). Dans la phase de différenciation, le facteur de transcription Sox9 permet l'expression du collagène de type IIa (Col2 α 1) mais aussi l'expression d'autres protéines matricielles du cartilage tels que Col1 α 2 (Eames BF *et al.*, 2003).

Deux autres membres de la famille des facteurs transcriptionnels Sox (L-Sox5 et Sox6) co-exprimés avec Sox9 dans cette étape sont indispensables pour permettre la différenciation des chondro-progéniteurs en chondrocytes (Lefebvre V *et al.*, 1998). En effet, la présence de Sox5 et Sox6 permet l'expression des collagènes de type II, IX, des agrécannes et des protéines de liaison (Smits P *et al.*, 2001). Un autre facteur de transcription, le Runx2, intervient dans la phase de différenciation chondrocytaire. Comme le montre la figure 22, ce facteur est également présent dans les autres étapes telles que la condensation et l'ossification (Ducy P *et al.*, 1997).

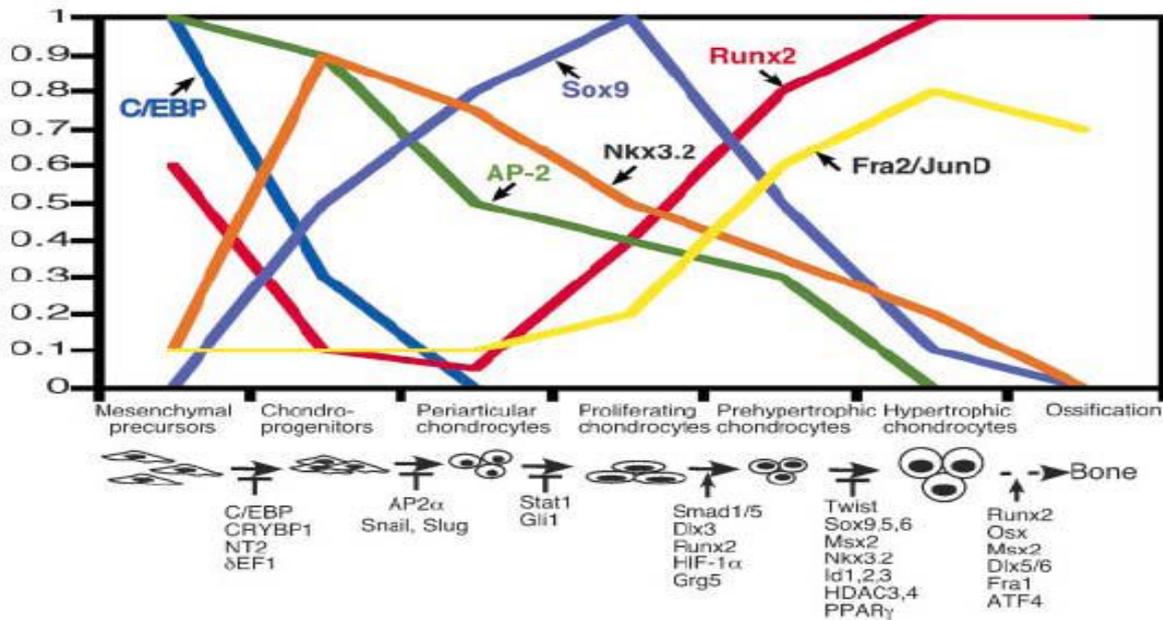


Figure. 22 Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale.

*Des facteurs de transcription sont soit des inhibiteurs (⊥) soit des activateurs (↑) des différentes étapes. (D'après Goldring MB *et al.*, 2006).*

II.8. 3.2. L'hypertrophie des chondrocytes

Dans cette étape, les chondrocytes différenciés deviennent des chondrocytes hypertrophiques et commencent à exprimer leur seul marqueur spécifique à savoir le collagène de type X (St-Jacques B *et al.*, 1999).

La transcription du collagène de type X est régulée par le facteur de transcription Runx2 dont l'expression est augmentée dans l'étape d'hypertrophie de la chondrogenèse (Shen G *et al.*, 2005).

L'apparition de ce type de collagène indique le stade terminal de la chondrogenèse et le début de l'ostéogenèse où le collagène de type X facilite le dépôt de la matrice osseuse et la calcification (Enomoto H *et al.*, 2002). La chondrogenèse et l'ostéogenèse sont donc étroitement coordonnées par l'étape d'hypertrophie de chondrocytes.

II.8. 3.3. Les marqueurs de la différenciation chondrocytaire

Les collagènes de types II, IX et l'aggrécane sont caractéristiques de la réparation par ossification endochondrale. **Le collagène de type I** s'exprime dès le 5ème jour de réparation, au niveau des centres d'ossification primaire en bordure des fragments d'une fracture non stabilisée, et au sein des lésions se réparant par ossification intramembranaire. Dans l'ossification endochondrale, mise en place dans les fractures non-stabilisées, la composition du cal cartilagineux joue un rôle dans le contrôle du remodelage du cartilage. Ainsi, l'absence de collagène IX, dans un modèle de réparation chez la souris, induit une persistance du cartilage au niveau du site de fracture et un retard de remodelage en os primaire (Opolka *et al.*, 2007).

Le marqueur de la condensation des chondrocytes est le facteur de transcription Sox9. Sox9 appartient à la famille des « high-mobility group box » (HMGB). Il est exprimé dans les précurseurs des chondrocytes et dans les chondrocytes en prolifération (Fig. 22), (Wuelling et Vortkamp, 2010). Sox9 co-activé par Sox 5 et 6, est essentiel pour la condensation mésenchymateuse et par conséquent pour la formation du cartilage (Hojo *et al.*, 2010). Dans des cellules en culture, Sox9 stimule la transcription de gènes de la matrice du cartilage, incluant *Col2a1*, *Colla2* et *aggrécane* (Kronenberg, 2003).

II.8. 3.1. Collagène de type I

Pour l'os, les critères d'évaluation nécessaires des réseaux de gènes régulateurs sont les gènes spécifiques exprimés par les ostéoblastes pour fabriquer du tissu différencié. Il est utile de comparer l'os avec les tissus liés au cartilage. Le composant protéique le plus abondant dans l'os est le collagène fibrillaire de type I (Fischer et Odendaal, 2012).

Parmi les protéines collagéniques La molécule de collagène de type I dit fibrillaire, est prépondérante dans la MEC osseuse. Elle est constituée d'une triple hélice correspondant à un enchevêtrement de deux chaînes identiques $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$.

Les molécules s'alignent ensuite dans la matrice extracellulaire pour constituer les fibres de collagène créant des « vides », servant de sites de nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite.

Le collagène de type I est synthétisé par quelques types de cellules comprenant des fibroblastes, des ostéoblastes, des odontoblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules mésenchymateuses (Hasegawa *et al.*, 2000) et (Rossert *et al.*, 2003). C'est un hétérotrimère composé de deux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ formant une triple hélice caractéristique. Il y a donc deux gènes codant pour le collagène de type I qui se nomment :

- *Colla1*, l'allèle $\alpha 1$ est situé sur le chromosome 17 (17q21.33) et a deux variations de transcription codant pour la chaîne pro-alpha-1 de type I collagène.
- *Colla2*, l'allèle $\alpha 2$ codant pour la chaîne pro-alpha 2 est situé sur le locus 7q22.1 et dispose de trois variations de transcription, résultant de l'utilisation des signaux de polyadénylation alternatifs (Csomor *et al.*, 2001).

L'expression de *Colla1* est 3 à 4 fois plus élevée dans les ostéoblastes arthrosiques que dans les ostéoblastes sains, alors que l'expression de *Colla2* ne change pas (Couchourel *et al.*, 2009).

Très peu d'informations sont connues sur la régulation de l'expression de ce gène dans les ostéoblastes (Rossert *et al.*, 2003). Il joue un rôle essentiel dans la minéralisation et est très utilisé pour des applications sur l'ingénierie des tissus osseux (Mathews *et al.*, 2012).

Le Collagène de type I est une structure protéique hautement conservée, formant des fibres qui jouent un rôle fondamental dans l'intégrité de divers tissus conjonctifs tels que l'os, la cornée, le derme et le tendon (Csomor *et al.*, 2001). Les changements dans la synthèse de collagène de type I ne se produisent pas seulement pendant le développement embryonnaire dans des tissus spécifiques, mais aussi dans des conditions pathologiques comme, par exemple, au cours de la cicatrisation de plaies ou chez les patients atteints de fibrose pulmonaire. (Hasegawa *et al.*, 2000).

II.8. 3.2. Collagène de type X

Le collagène de type X (Fig. 21) est synthétisé dans les tissus cartilagineux de la plaque de croissance et de la région calcifiante du sternum et semble être le seul dans le processus d'ossification endochondrale (Grant *et al.*, 1987).

Il est synthétisé par les chondrocytes en phase terminale de différenciation, c'est-à-dire les chondrocytes hypertrophiques.

Les collagènes à chaîne courte ont une chaîne polypeptidique qui constitue la moitié de la longueur des collagènes fibrillaires et ont une organisation des gènes distincte codant pour presque toute la protéine. Le collagène de type X en fait partie, c'est un homotrimère comprenant trois chaînes $\alpha 1(X)$, il est composé d'un gène, Col10a1, qui code pour une chaîne $\alpha 1$ du collagène de type X (Apte *et al.*, 1992).

La fonction biologique du collagène de type X permet de faciliter le processus de calcification, éventuellement par le biais des changements d'organisation matricielle (Shen, 2005). L'augmentation de la production de collagène de type X semble être un important prérequis pour la formation des centres d'ossification. Le collagène de type X pourrait aussi avoir un rôle dans l'initiation de la minéralisation de la matrice.

II. 9. Composition du tissu osseux en lipides

Le tissu osseux est constitué d'eau (environ 1/4 du poids de l'os), de matières organiques (environ 1/3 du poids de l'os, dont la majeure partie est représentée par une protéine, l'osséine) et de sels minéraux inorganiques (le calcium, le phosphore, et le magnésium prédominant, bien que l'on trouve également du fer, du sodium, du potassium, du chlore, et du fluor en petites quantités). La plupart des os (à l'exception de ceux du crâne) apparaissent d'abord sous la forme d'une ébauche cartilagineuse qui s'ossifie ensuite au fur et à mesure de la croissance du nouveau-né.

Les contrôles porteraient sur deux catégories de matières premières (les « os lourds » et les « os légers ») dont le taux de lipides est compris entre 2,5 et 4 % du poids sec. Les lipides du tissu osseux sont plus riches en phospholipides que ceux de la moelle osseuse correspondante. L'examen des compositions en acides gras montre que les pourcentages d'acides gras saturés sont plus faibles dans la moelle épinière (34,3 %) que dans les moelles osseuses (49 à 60 % selon l'origine).

Les différences les plus remarquables entre moelle épinière et moelles osseuses concernent d'une part les acides gras saturés et mono-insaturés à chaînes très longues (AGTLC), d'autre part les diméthylacétals (DMA).

Les AGTLC constituent 26,7 % des acides gras de la moelle épinière ; il s'agit des acides 20:1 (9,3 %), 24:0 (3,6 %) et 24:1 n-9 (8,4 %) ; on trouve également les acides 20:0, 22:0, 22:1 et 23:0.

Ces acides gras sont caractéristiques de la sphingomyéline et des cérébrosides, lipides polaires du tissu nerveux. Comme attendu, la moelle osseuse, dépourvue de cette catégorie de lipides, contient peu d'AGTLC (0,3 et 0,7 % respectivement pour la moelle des os longs et plats de bœuf ; 1,83 % pour la moelle des os longs de porc). On remarque que le tissu osseux, quelle que soit son origine, contient très peu d'AGTLC (de 0,3 à 0,5 %) (Combe *et al.*, 2002).

II. 10. Lipides et tissus osseux

la littérature a largement liée l'apport lipidique et le statut inflammatoire, un protagoniste clé impliqué dans la résorption osseuse (Ono *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2009). En effet, l'inflammation favorise la dégradation osseuse en stimulant l'activité des ostéoclastes, tout en inhibant la formation osseuse ostéoblastique entraînant un déséquilibre du remodelage osseux et une perte osseuse.

À ce sujet, les lipides présentent une dualité d'action, avec tantôt des effets pro- et tantôt des effets anti-inflammatoires en fonction de leurs structures et de leur métabolisme (Laneuville *et al.*, 1995; Raisz *et al.*, 1989). Dans ce contexte, un nombre croissant de publications a permis de mettre en évidence que les acides gras de la famille des ω -6 étaient associés à une perte osseuse accrue, tandis que les ω -3 sont pressentis pour protéger le capital osseux (Corwin, 2003; Ono *et al.*, 2005; Calder, 2006 ; Tsutsumi *et al.*, 2009). Néanmoins, ce débat reste controversé et les mécanismes d'action sont mal connus.

III. Les lipides

Dans ce travail, Cette partie, non exhaustive, rappelle quelques généralités sur les structures moléculaires des principaux lipides qui ont été étudiés lors de cette thèse. Les connaissances sur le métabolisme et les fonctions principales de ces lipides seront aussi évoquées, en mentionnant ce qui est connu chez les mollusques bivalves lorsque les données existent.

III.1 Définition

Aucune définition précise du terme lipide n'existe étant donné la variété des substances qu'il regroupe. Dans son sens le plus large, il désigne l'ensemble des molécules telles que les huiles, les graisses et les cires, qui partagent les propriétés suivantes :

- Originaires d'animaux ou de plantes vivants ou fossilisés.
- Insolubles ou immiscibles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques comme le chloroforme, l'éther diéthylique, le benzène ou l'acétone.

□ Formées principalement de longues chaînes hydrocarbonées, mais pouvant aussi contenir de l'oxygène, du phosphore, du soufre ou de l'azote.

Cette définition inclut une gamme de molécules très diverses, comme les acides gras et leurs dérivés, les caroténoïdes, les terpènes, les stéroïdes et les acides biliaires, qui n'ont que très peu de points communs au niveau structural ou fonctionnel. Une définition plus cohérente du point de vue biologique et fonctionnel a alors été proposée : « les lipides sont les acides gras, leurs dérivés, et les substances qui leur sont reliées, du point de vue de la biosynthèse ou du rôle fonctionnel ».

Les lipides ou «corps gras» sont insolubles dans l'eau et solubles dans divers solvants organiques (Alcool, éther, benzène, chloroforme, etc.). Contenant une forte proportion de groupement non polaires hydrophobes et des groupements polaires hydrophiles (COOH), ils ont la propriété, par leurs constituants bipolaires, de s'orienter au contact de l'eau. Ce sont des constituants importants de la cellule dont la dégradation libère une grande quantité d'énergie. Ils constituent en outre l'élément architectural de toutes les membranes cellulaires (Fain-Maurel, 1994).

Les lipides ont des rôles biologiques essentiels : ce sont, par excellence, des molécules biologiques multifonctionnelles. Les lipides peuvent intervenir aussi bien comme éléments structuraux dans les membranes cellulaires (phospholipides et stérols), que comme connecteurs permettant l'insertion membranaire de certaines protéines ou comme métabolites particulièrement riches en énergie lorsqu'il s'agit des acides gras, par exemple.

Ils sont aussi des précurseurs d'un grand nombre de messagers intra- et extracellulaires (eicosanoïdes, diacylglycérol, phosphoinositides, stéroïdes, céramides, ...).

III.2 les lipides membranaires contre les Lipides de reserve

En fonction de leur affinité pour certains solvants en chromatographie liquide, les lipides peuvent être subdivisés en deux grandes classes : les lipides neutres et les lipides polaires (Figure 19). Cette subdivision, bien qu'assez imprécise, est très largement utilisée dans la littérature, dans la mesure où elle se retrouve lors des séparations méthodologiques (bien qu'il y ait à ce sujet une certaine confusion entre la polarité des composés eux-mêmes et celle des solvants utilisés pour leur séparation).

Il a aussi été proposé d'utiliser, à la place des termes lipides neutres et polaires, les termes lipides simples et lipides complexes (les premiers générant, par hydrolyse, au plus deux constituants primaires par mole, les seconds trois (ou plus) constituants primaires par mole),

ou bien les termes lipides de réserve et lipides membranaires. A l'exception des stérols, qui sont considérés comme des lipides simples neutres, mais localisés dans les membranes cellulaires, on observe une très bonne adéquation entre les différentes terminologies (Fig. 23).

Dans la présente thèse, les lipides ont été différenciés en lipides de réserves et lipides polaires ou membranaires. En effet, ces termes ont semblé être les plus adéquats, puisqu'ils reflètent une réalité fonctionnelle. Les triglycérides peuvent être considérés comme les représentants essentiels des lipides de réserve, mais on peut également y trouver des diglycérides, des monoglycérides, des esters de stérols ou d'alcools gras (cires), des alcools gras et des acides gras libres. Parmi les lipides membranaires, on trouve des sphingolipides, des glycolipides, des phospholipides et des stérols.

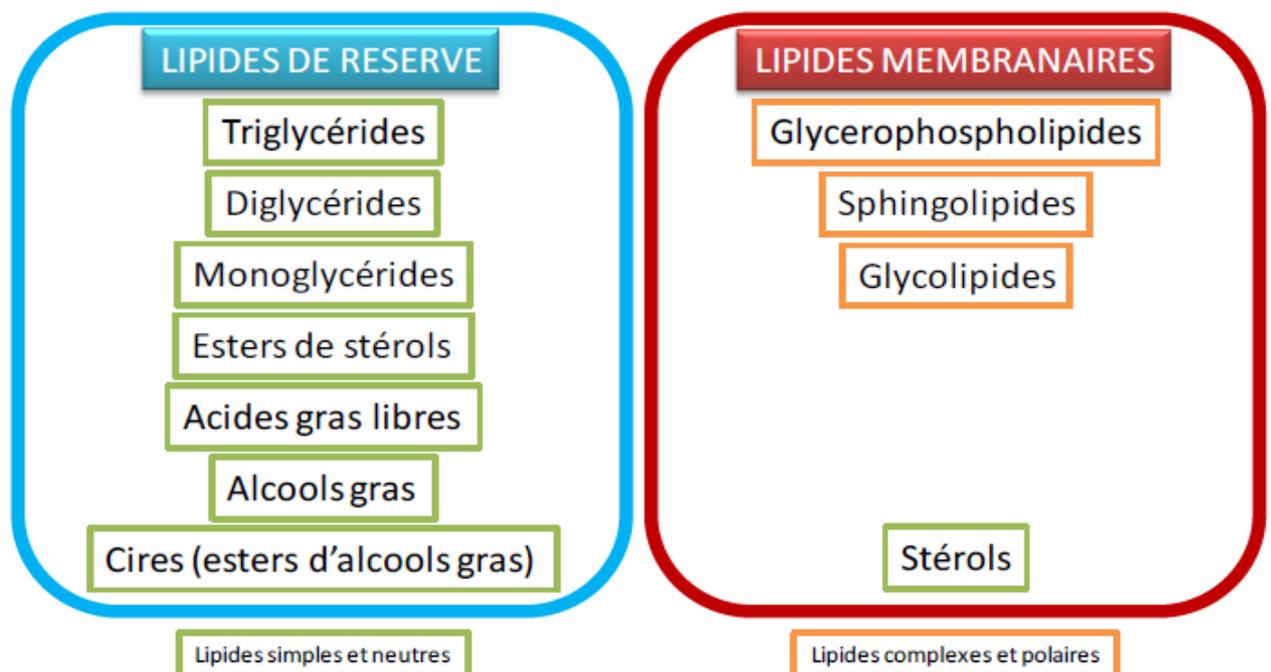


Figure 23. Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires.

III.3 lipides membranaires et membranes cellulaires

Les lipides membranaires sont caractérisés par leur caractère amphiphile. En effet, ils possèdent une tête polaire, relativement importante et qui présente un caractère hydrophile, reliée à des chaînes aliphatiques hydrophobes. De part leur nature amphiphile, ces molécules ont tendance à s'agréger spontanément, de façon à mettre leurs têtes polaires en contact avec l'eau et en isoler leurs chaînes hydrophobes. Cela provoque la formation de micelles ou de « bicouches lipidiques » (Fig. 24). Les lipides membranaires, organisés en bicouches lipidiques, représentent les constituants majoritaires, l'ossature, des membranes cellulaires dans lesquelles sont insérées des protéines (Fig. 25).

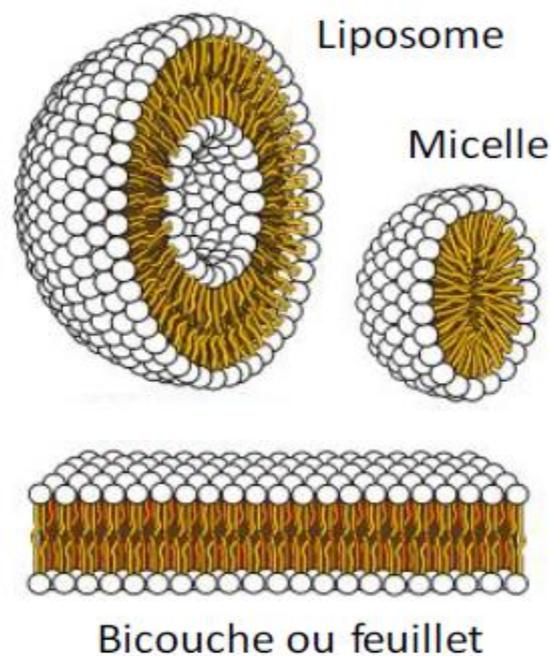


Figure 24. Différents modes d'arrangement spontané de molécules lipidiques amphiphiles en environnement aqueux : liposome, micelle et bicouche ou feuillet (Cullis *et al.*, 1963).

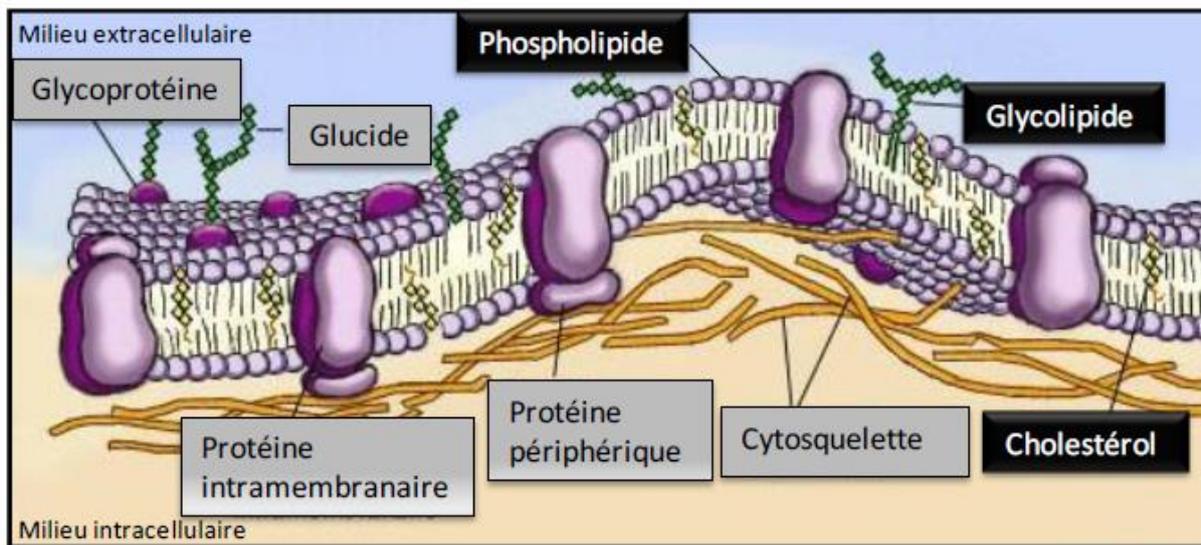


Figure 25: Eléments structuraux d'une membrane cellulaire (Yann, 2004).

III.4 Structure des lipides membranaires

Différents types de lipides membranaires existent : les glycérophospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols. Les glycolipides, qui sont généralement des composants minoritaires chez les bivalves marins, ne seront pas abordés ici ainsi que les lipides de réserves. Les glycérophospholipides ainsi que les représentants majoritaires des sphingolipides dans les membranes cellulaires animales, les sphingophospholipides, sont constitués d'acides gras reliés à une tête polaire formée par un groupement phosphate et sont regroupés sous le terme commun de phospholipides.

III.4.1 Acides gras

Les acides gras sont des constituants de la plupart des catégories lipidiques. Ce sont des acides organiques à longue chaîne (4 à 24 atomes de carbone) possédant une seule fonction carboxylique et une queue hydroxylée, non polaire et qui donne aux lipides leur insolubilité par la formule suivante:



Les acides gras sont généralement constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire, possédant un groupement carboxyle (-COOH). Ils se distinguent par la longueur de leur chaîne et par le nombre et la position des insaturations présentes.

Dans ce travail, ils sont identifiés par la formule C:Xn-Y où C est le nombre de carbones, X le nombre de doubles liaisons et Y la position de la première double liaison comptée à partir du méthyle terminal.

Les doubles liaisons sont supposées être de configuration *cis* et se succéder, en alternance avec un groupement méthyle CH₂. En fonction du nombre d'insaturations qu'ils comportent, les acides gras peuvent être classés en trois catégories (Fig. 26): Les acides gras peuvent être saturés ne comportant pas de doubles liaisons, ou insaturés soient monoinsaturés avec une seule double liaison soient polyinsaturés avec plusieurs doubles liaisons

Un acide gras est une molécule formée d'une chaîne de carbones liés à des hydrogènes (c'est ce qu'on appelle un hydrocarbure en chimie organique) terminée par un groupement acide : COOH (rappelant que les chimistes commencent à compter les carbones à partir du groupement acide COOH par contre les biochimistes les comptent suivant l'écriture française).

Ainsi, l'acide arachidonique CH₃-(CH₂)₃-(CH=CH-CH₂)₄-(CH₂)₃-COOH s'écrit 20:4Δ 5, 8, 11, 14 ; 20 :4 n-6 ou 20 :4w6 et fait référence à l'arachide. Cette démonstration montre bien le manque de précision de la nomenclature en « w » du fait du manque d'informations concernant les autres doubles liaisons. Cependant, la nomenclature en « n » sera utilisée pour la suite de cette thèse.

Dans les aliments d'origine végétale, la chaîne carbonée comporte rarement plus de 18 atomes de carbone. Dans les aliments d'origine animale et dans notre organisme, la chaîne carbonée peut atteindre plus de 30 atomes de carbone : cet « allongement » est possible grâce à des métabolismes complexes au sein de nos cellules.

Acides gras saturés (AGS) Ce sont les acides gras dont la longue chaîne d'hydrocarbures est totalement saturée, c'est-à-dire ne contient que des liaisons simples, comme le 16:0 Acides gras monoinsaturés (AGMI) Ils sont caractérisés par la présence dans leur formule chimique d'une seule double liaison, comme le 18:1n-9 Acides gras polyinsaturés (AGPI) (contenant plusieurs doubles-liaisons). Ils sont caractérisés par la présence dans leur formule chimique de plusieurs doubles liaisons: Les oméga-3 et les oméga-6 appartiennent à la famille des acides gras et se caractérisent par la présence d'une double liaison sur le carbone n-3 ou sur le carbone n-6, respectivement.

ce sont les acides gras polyinsaturés (w3) (ou n-3), (w6) (ou n-6), (w7) (ou n-7) ou (w9) (ou n-9) où les chiffres 3, 6,7 et 9 indiquent la position de la double liaison la plus proche du carbone méthylé, comme le 20:4n-6.

Chez les bivalves, d'autres acides gras, dits particuliers, existent. Il s'agit des acides gras dits « non-methylene-interrupted » (NMI) et des acides gras branchés. Les premiers se distinguent par la présence de plus d'un groupement méthyle entre chaque double liaison (Fig. 27). Les seconds sont caractérisés par le branchement d'un groupement méthyle sur un carbone de la chaîne : en position iso ou anteiso (Fig. 28).

Les acides gras saturés sont synthétisés à partir de l'acétyl-CoA et servent de précurseurs aux acides gras monoinsaturés des familles (n-7) et (n-9) tels que l'acide palmitoléique C16:1(n-7) et l'acide oléique C18:1(n-9). Ces derniers jouent également le rôle de précurseurs des autres acides gras polyinsaturés des séries (n-7) et (n-9).

Dans l'organisme, ce passage des acides gras saturés aux monoinsaturés se fait sous l'action d'une enzyme la $\Delta 9$ désaturase.

Les animaux sont capables de synthétiser intégralement les acides gras des séries (n-9) et (n-7) mais sont incapables de synthétiser les acides gras séries (n-6) et (n-3), en l'absence des désaturases correspondantes. Les précurseurs des acides gras polyinsaturés des séries (n-6) et (n-3) doivent donc être apportés par l'alimentation. Ainsi, les acides linoléiques et linoléniques sont des acides gras essentiels, car l'organisme tant animal qu'humain, ne peut pas les synthétiser.

Les propriétés physiques et chimiques des acides gras changent selon la longueur, le nombre et la disposition des doubles liaisons. Le point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne et diminue avec le nombre de doubles liaisons. Ces deux paramètres sont encore considérés comme pouvant être déterminants pour la fluidité des membranes biologiques.

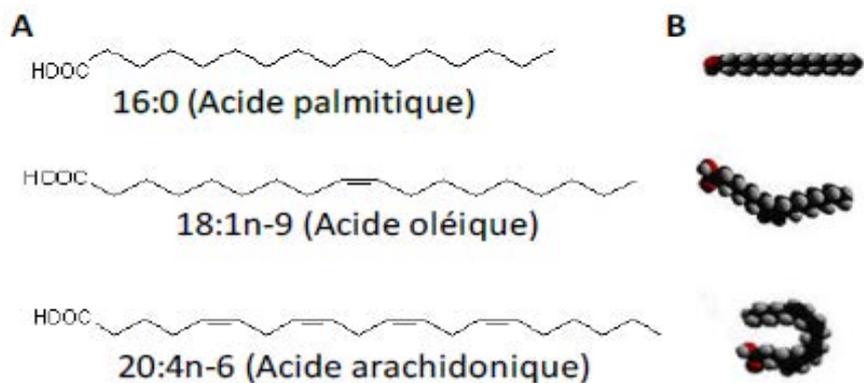


Figure 26. Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ».

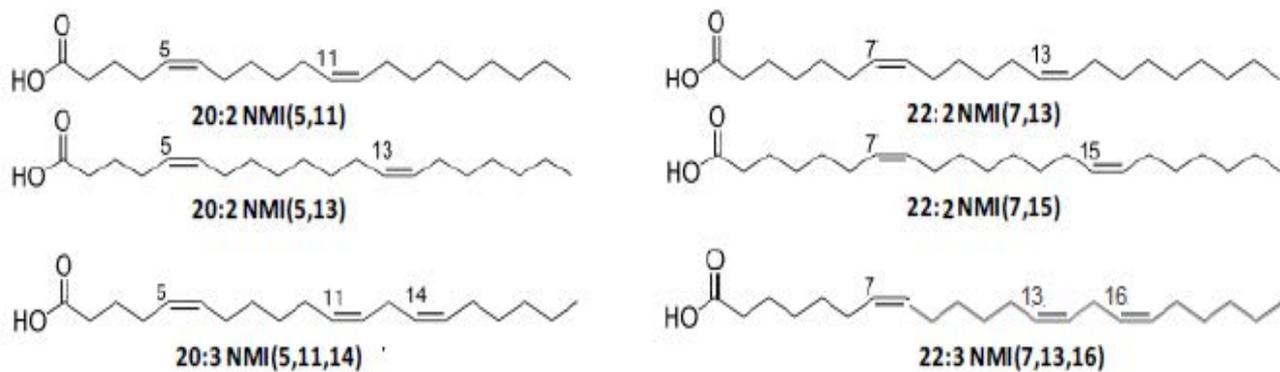


Figure 27. Structure des acides gras NMI chez les mollusques bivalves. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de chacune des doubles liaisons, comptée à partir de la fonction acide.

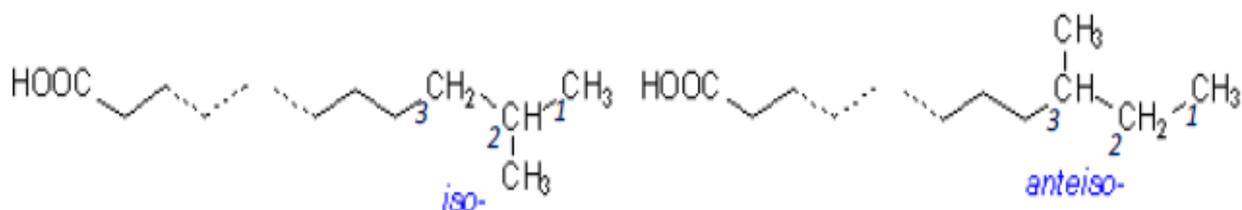


Figure 28. Structure des acides gras branchés de forme « iso » et « anteiso »

III.4.2 Classes de phospholipides

L'ensemble des acides gras décrits ci-dessus interviennent rarement sous forme libre et sont en fait constitutifs de molécules plus importantes dans lesquelles ils jouent le rôle de partie hydrophobe. Dans le cas des phospholipides, un ou plusieurs acides gras sont liés :

- dans le cas des glycérophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison ester à un alcool, le glycérol (il existe également des cas où la liaison est une liaison éther ou vinyl-éther)
- dans le cas des sphingophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison, amide à une base azotée à longue chaîne (amine aliphatique ayant deux ou trois groupements hydroxyyles), principalement la sphingosine.

Ces composés sont ensuite reliés à une tête polaire, composée d'un groupement phosphate (acide phosphorique) lié ou non à d'autres structure chimiques variées. Ces phospholipides membranaires se distribuent ainsi en plusieurs classes, à chaque tête polaire correspondant une classe de phospholipides. Les principales classes de glycérophospholipides et de sphingolipides sont représentées dans la figure 29.

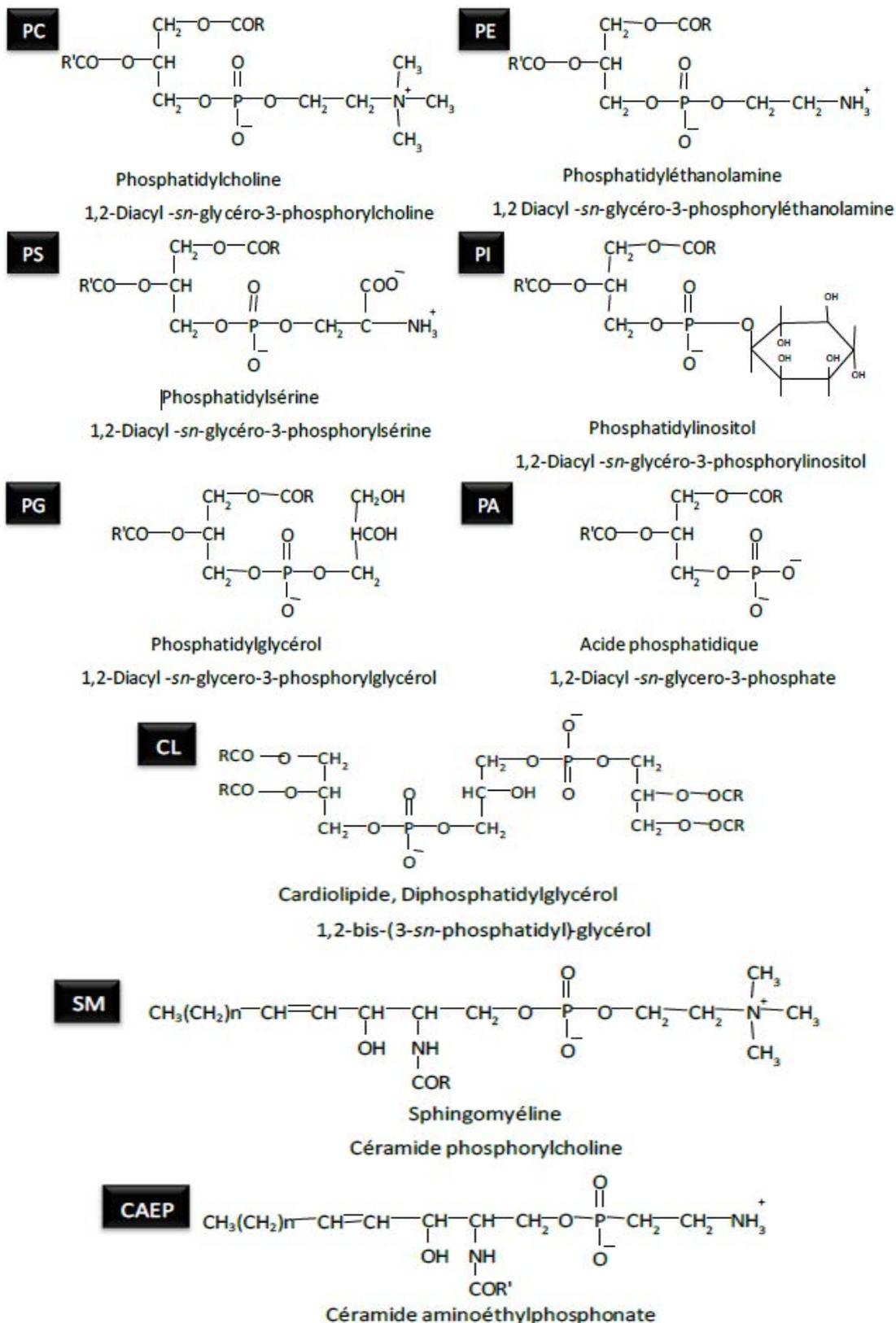
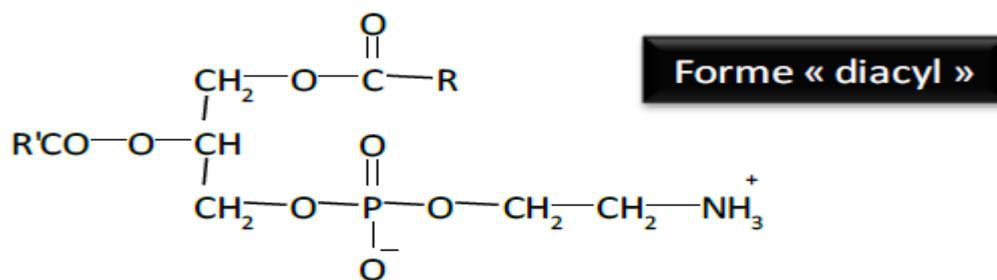


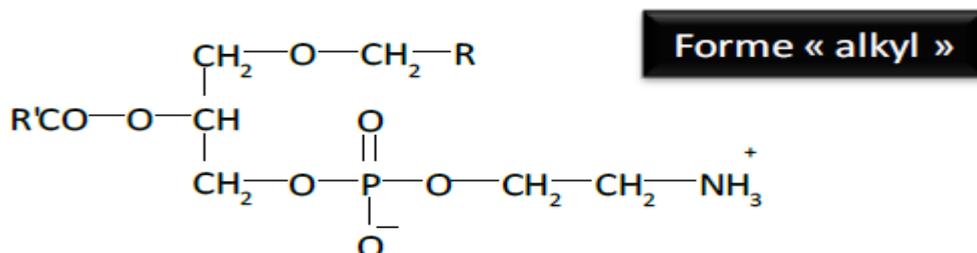
Figure 29. Structure des principaux phospholipides

III.4.3 Sous-classes de glycérophospholipides

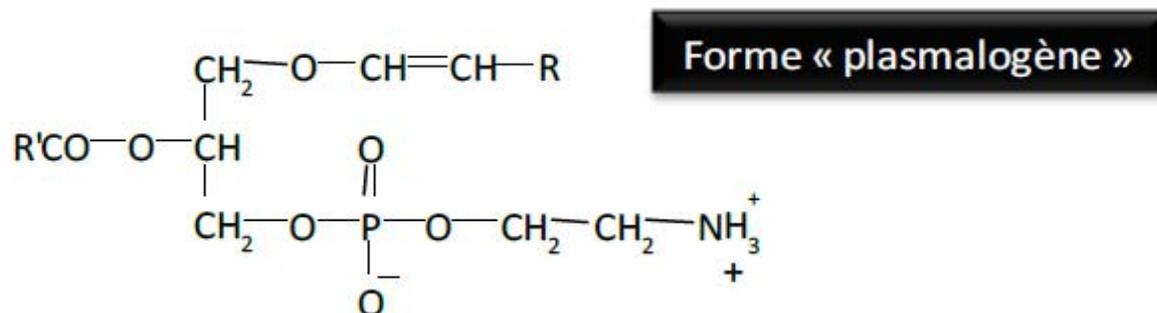
Les glycérophospholipides sont le plus souvent des diacylglycérophospholipides : c'est à dire que chimiquement, deux acides gras sont liés en position *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol par une fonction ester (Fig. 30). Le symbole *sn* (pour *stereospecific numbering*) désigne par convention les carbones du glycérol, numérotés 1, 2, 3 de haut en bas sur une projection de Fischer où le second hydroxyle est placé à gauche. Cette forme « diacyl » est la plus courante chez les mammifères. Cependant, certains phospholipides contiennent une liaison éther à la place d'une liaison ester en *sn*-1. Il existe 2 types de liaison éther de la chaîne aliphatique : celle avec un groupe alkyl est appelée alkyl-éther et regroupe la famille des alkylacylglycerophospholipides (forme « alkyl ») et celle avec un groupe alk-1- enyl est appelée vinyl-éther. Les phospholipides avec une liaison vinyl-éther sont regroupés sous le terme d'alk-1-enylglycerophospholipides ou, plus généralement, de « plasmalogènes ». Il existe également des lysoacylglycérophospholipides, ne présentant qu'une seule chaîne aliphatique : un acide gras estérifié en position *sn*-1 du glycérol (Fig. 30).



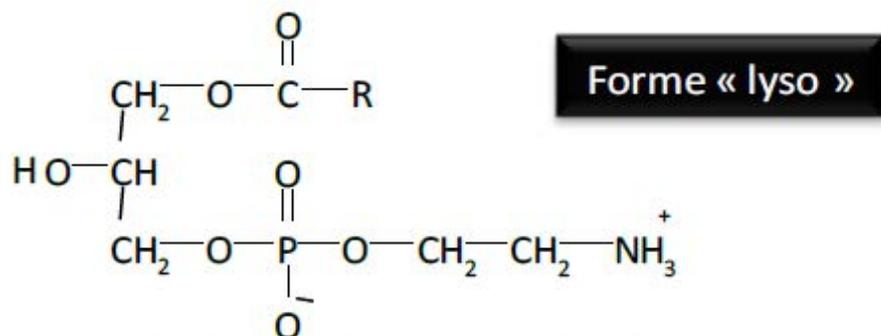
1acyl -2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



1alkyl-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



1alkenyl-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



1acyl -2lyso-glycéro-3-phosphoéthanolamine

Figure 30. Structure des différentes sous-classes de la phosphatidyléthanolamine

III.5 Compositions lipidiques membranaires

III.5.1 composition en classes de phospholipides

La composition relative moyenne des classes de phospholipides membranaires chez les mammifères est spécifique des organes et/ou des fractions subcellulaires. Les principales classes de phospholipides, PC, PE, PI et PS observées chez les mammifères sont retrouvées chez les mollusques. Néanmoins, il existe des variations selon les espèces, au niveau de l'individu entier, et au niveau des organes différenciés (Vaskovsky, 1989; Kostetsky et Velansky, 2009) (Tab. II). Les facteurs qui influencent la composition en phospholipides peuvent être endogènes (sexe, reproduction) ou exogènes (salinité, température, saison, nutrition) (Vaskovsky, 1989).

Contrairement aux mammifères et aux poissons, la sphingomyéline n'existe pas chez les bivalves à quelques exceptions près (Sargent, 1989). Cependant, la présence d'autres sphingolipides, notamment de CAEP (céramide aminoéthylphosphonate) a été mise en évidence chez beaucoup d'espèces d'invertébrés (Joseph, 1982; Vaskovsky, 1989). La structure du CAEP diffère de celle de la sphingomyéline par la nature sa tête polaire (éthanolamine au lieu de sérine), et la nature de la liaison avec l'acide gras (O-P-C au lieu de O-P-O).

Ce phosphonolipide a été mis en évidence pour la première fois chez les bivalves par Matsubara (Matsubara et Hayashi, 1973) dans la chair de *C. gigas*. Selon la littérature, les proportions de CAEP retrouvées chez les invertébrés varient de 6 % du total des phospholipides chez l'ormeau *Haliotis midae* (De Koning, 1966) à 20,2 % dans les érythrocytes de *Scapharca broughtoni* (Chelomin et Zhukova, 1981). Récemment, une étude a mis en évidence des variations importantes de teneur en CAEP en fonction des espèces et des tissus étudiés, les plus fortes étant observées dans les branchies et les muscles de la moule *Crenomytilus grayanus* (16.8% dans les deux organes) (Kostetsky et Velansky, 2009). On suppose que ce phosphonosphingolipide remplace la sphingomyéline chez les invertébrés, même si certains mollusques semblent posséder les deux (Vaskovsky, 1989).

Table II. Composition relative des phospholipides de mollusques (%). Extrait de Vaskovsky (1989).

Espèces de mollusques	PC	PE	PS	PI	SM	PG+ CL	PA	CAEP	Autres
<i>Haliotis midae</i>	41	32	5	5	1	10		6	
<i>Neptunea constricta</i>	35,8	31,6	8,8	3,7	-	1,5	+	11,3	3,3
<i>Mytilus platensis</i>	40,8	18,8	6,3	6,3		11,8			9,2
<i>Modiolus difficilis</i>	24,6	27,5	8,5	5,3		2,4		15,8	13,3
<i>Callista brevisiphonata</i>	31,2	34,1	11,9	5,3		1,7	+	12,2	1,9
<i>Mesodesma mactroides</i>	51,5	11,7	11,2		5,5	5,6			11,5
<i>Octopus vulgaris</i>	42	30	5	4	3	3		13	13
<i>Octopus sp.</i>	39,4	33,5	6,0		9,3	1,2	-	6,8	3,2

PC : glycérophosphatidylcholine, PE : glycérophosphatidyléthanolamine, PS : glycérophosphatidylsérine, PI : glycérophosphatidylinositol, SM : sphingomyéline, PG: phosphatidylglycérol, CL : cardiolipide, PA : acide phosphatidique, CAEP : céramide aminoéthylphosphonate.

III.5.2 Composition en sous-classes de glycerophospholipides

Chez les mammifères, les formes 1-alkyl se rencontrent généralement dans la PC et les formes 1-alkényl dans la PE (Paltauf, 1983b). Ces éther-phospholipides sont présents en quantité relativement abondante dans certains tissus. Chez l'humain, la plus forte proportion de la forme plasmalogène au sein de la PE (76%) a été reportée dans la membrane plasmique de cellules immunitaires (MacDonald et Sprecher, 1989). La forme éthanolamine plasmalogène est aussi importante dans les cellules de tissus cruciaux tels que les érythrocytes, les plaquettes ou le cerveau, où elle représente 40 à 60 % de la PE (Scherrer et Gross, 1989; Nagan et Zoeller, 2001). Au niveau subcellulaire, les plasmalogènes seraient plutôt concentrés dans la membrane plasmique, mais ils ont aussi été mis en évidence dans le réticulum endoplasmique, dans les membranes externe et interne des mitochondries et dans la membrane du noyau (Daum, 1985; Wolff *et al.*, 1987).

Si on considère l'ensemble des phospholipides d'un individu, les mollusques se caractérisent par des proportions de plasmalogènes très importantes, souvent supérieures à celles rencontrées dans les érythrocytes ou le cerveau des mammifères (Dembitsky, 1979; Joseph, 1982; Chapelle, 1987; Sargent, 1989; Vaskovsky, 1989; Kraffe *et al.*, 2004; Hanuš *et al.*,

2009). Ces plasmalogènes sont trouvés majoritairement dans la PE et dans une moindre mesure dans la PC. Ils sont également importants dans la PS chez les mollusques, qui sont les seuls organismes à en contenir (Vaskovsky, 1989). Du point de vue cellulaire, de fortes proportions de formes plasmalogènes dans ces classes de phospholipides ont été trouvées dans les membranes d'érythrocytes de *Scapharca broughtoni* (Chelomin et Zhukova, 1981) et dans les branchies de bivalves (Chapelle, 1987; Kraffe *et al.*, 2004).

A notre connaissance, seulement deux études ont analysé l'existence des alkylacylglycerophospholipides dans les différentes classes de phospholipides de bivalves. Chez *C. gigas*, la sous-classe des alkylacylglycerophospholipides a été seulement observée dans la PC et la PE (Koizumi *et al.*, 1990). Au contraire, l'étude de huit espèces de bivalves a permis à Hanuš *et al.* (2009) de l'observer également dans la PS, où elle compterait pour 20% de cette classe. Les proportions observées de cette sous-classe étaient de 10% et 30% au sein de la PC et de 7% et 10% au sein de la PE, respectivement pour les études de Koizumi *et al.* (1990) et de Hanuš *et al.* (2009).

III.6 Biosynthèse des lipides membranaires

III.6.1 Biosynthèse des acides gras

La synthèse des acides gras commence par la carboxylation de l'acétyl Co-enzyme A en malonyl CoA catalysée par l'acétyl CoA carboxylase (ACC). Une molécule d'acide palmitique (C16:0) est formée par condensation d'une molécule d'acétyl CoA et de 7 molécules de malonyl. Ce processus est catalysé par un complexe multi-enzymatique : l'acide gras synthétase (fatty acid synthetase, FAS) (Fig. 31).

L'acide palmitique (C16:0) est le précurseur des autres acides gras par élongation et désaturation. L'élongation se fait par ajout d'une paire de carbones à partir de la fonction carboxyle et les enzymes correspondantes sont localisées dans les mitochondries. Les désaturations s'effectuent dans le réticulum endoplasmique.

La première double liaison est mise en place entre le 9^{ème} et le 10^{ème} atome de carbone (action d'une $\Delta 9$ désaturase). Le 18:1n-7 et le 16:1n-7 peuvent être ainsi obtenus à partir du 18:0 et du 16:0 (Fig. 31). Seuls les végétaux possèdent les enzymes $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases permettant la synthèse du 18:2n-6 et du 18:3n-3.

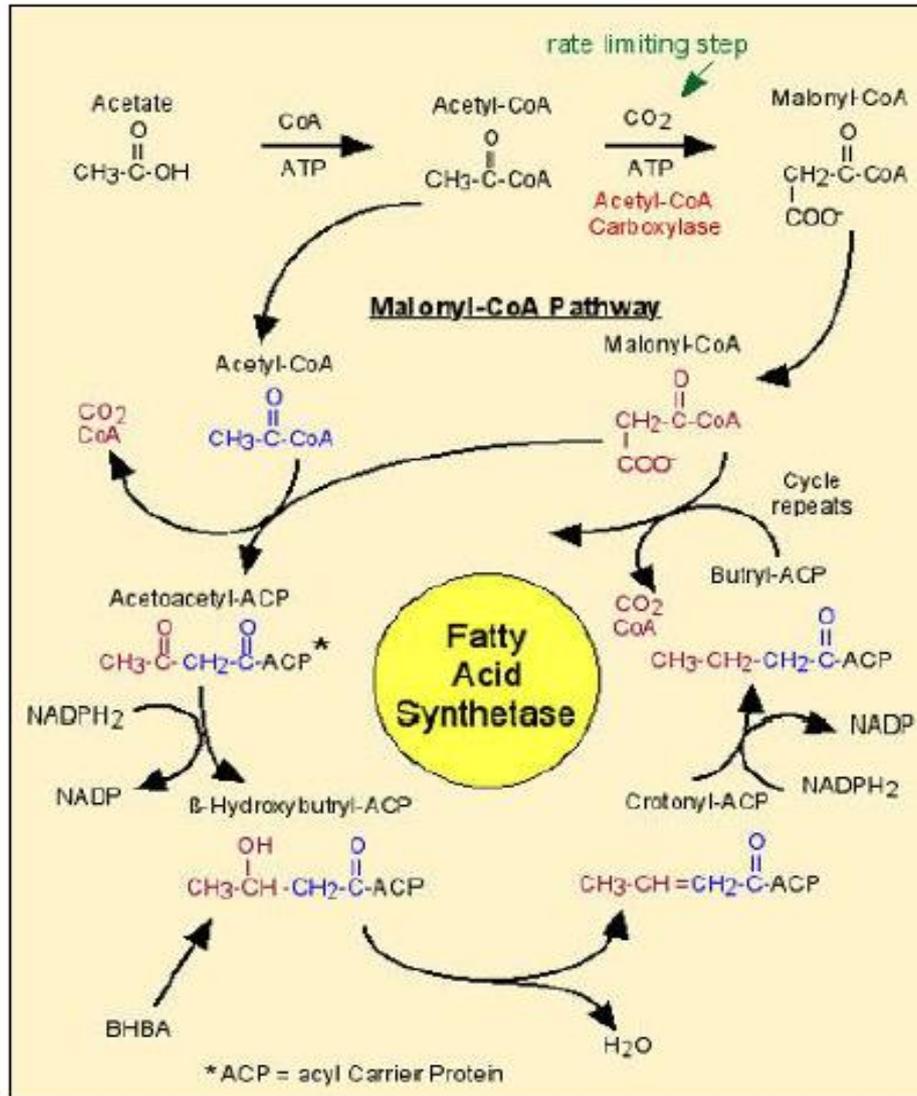


Figure 31. Biosynthèse de l'acide palmitique 16:0 (Maier *et al.*, 2006).

III.6 .2 Biosynthèse des acides gras chez les bivalves

Compte tenu de leur équipement enzymatique, les plantes supérieures ne biosynthétisent majoritairement que jusqu'au 18:2n-6 et 18:3n-3 (Fig. 32). Les animaux terrestres peuvent désaturer et élonguer ces précurseurs essentiels, points de départ des séries d'acides gras en n-6 et n-3, constituants majeurs des membranes ou précurseurs de substances régulatrices des fonctions cellulaires. En ce qui concerne la série en n-9, synthétisée à partir du 18:1n-9, celle-ci est considérée généralement comme une voie de compensation qui n'est visible qu'en cas de forte carence alimentaire (Tocher *et al.*, 1995).

A la différence des végétaux supérieurs, les microalgues marines, nourriture de base des animaux filtreurs que sont les bivalves, fabriquent les acides gras 18:2n-6 et 18:3n-3, mais aussi l'ensemble des acides gras à longues chaînes des séries n-6 et n-3, ces derniers étant généralement prépondérants. En revanche, la majorité des espèces animales marines ne sont pas ou peu capables de bioconvertir le 18:2n-6 et le 18:3n-3 alimentaires qu'il s'agisse des poissons (Owen *et al.*, 1975; Tocher *et al.*, 1989), des crustacés (Kanazawa *et al.*, 1979) ou des mollusques (De Moreno, 1980; Waldock et Holland, 1984).

De ce fait, les AGPI 20:4n-6, 20:5n-3 et 22:6n-3 sont considérés comme des acides gras essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des espèces marines (Trider et Castell, 1980; Uki *et al.*, 1986).

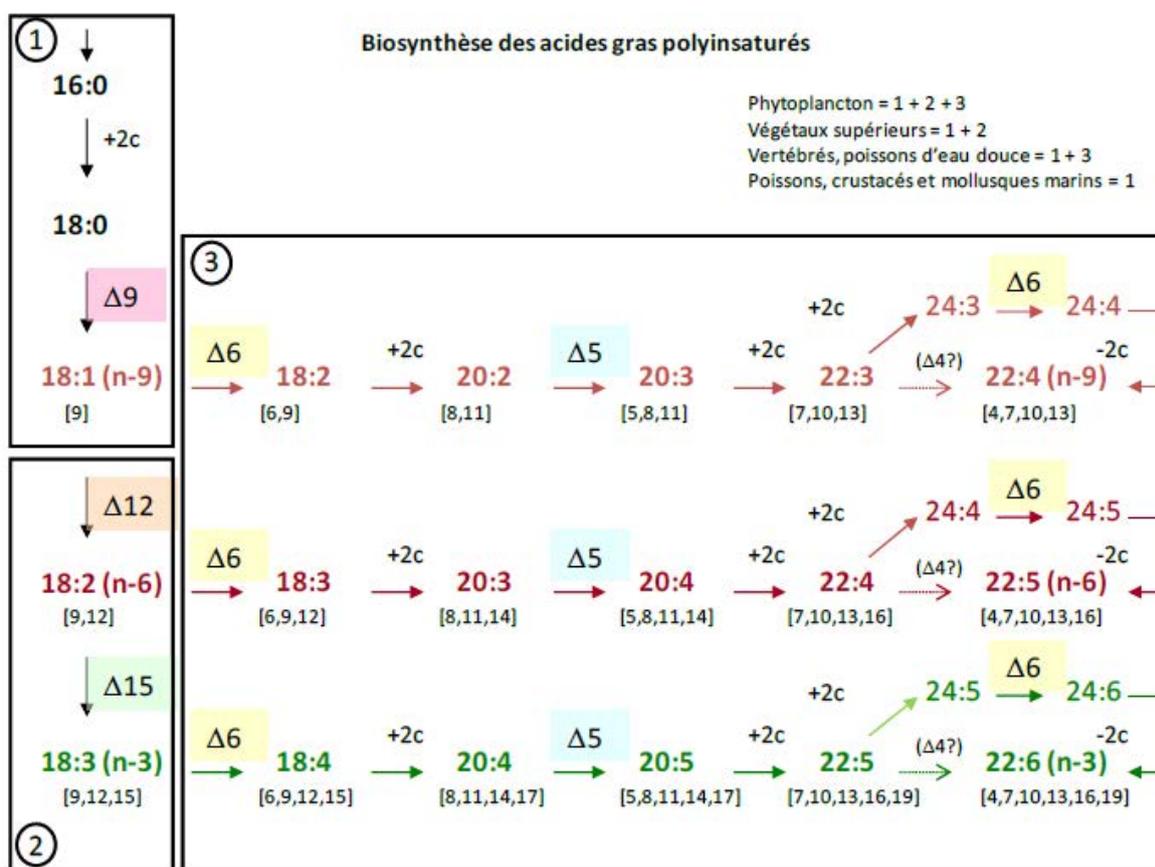


Figure 32. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Les chiffres entre [] indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide (Zhukova, 1991).

III.6 .3 Acides gras particuliers biosynthetyses chez les bivalves

Il existe cependant chez les mollusques des capacités à biosynthétiser certains AGPI particuliers : les acides gras dits « non-methylene-interrupted » (NMI) (Zhukova, 1986; 1991). Ces AGPI sont obtenus à partir du 16:0 et du 18:0 après plusieurs étapes d'élongation et deux étapes de désaturation en $\Delta 9$ puis en $\Delta 5$ (Fig. 33). Cependant, on peut souligner que cette capacité de désaturation en $\Delta 5$ se limite à ces acides gras NMI puisque la biosynthèse de 20:4n-6 et de 20:5n-3 n'existe pas ou est considérée comme très peu active chez ces mollusques (De Moreno *et al.*, 1976; Waldock et Holland, 1984). Un autre acide gras particulier, le 22:4n-9*trans* $\Delta 13$ est important chez les Pectinidés (Soudant *et al.*, 1995; Soudant *et al.*, 1996; 1997; Marty *et al.*, 1999). Il serait biosynthétisé par l'animal mais les intermédiaires de biosynthèse ne sont pas encore tous connus (Kraffe, 2003; Kraffe *et al.*, 2006). Enfin, un AGMI particulier, le 20:1n-11 a été également suggéré comme pouvant être biosynthétisé *de novo* à partir du 20:0, par l'action d'une $\Delta 9$ désaturase (Kraffe *et al.*, 2004) (Fig.33).

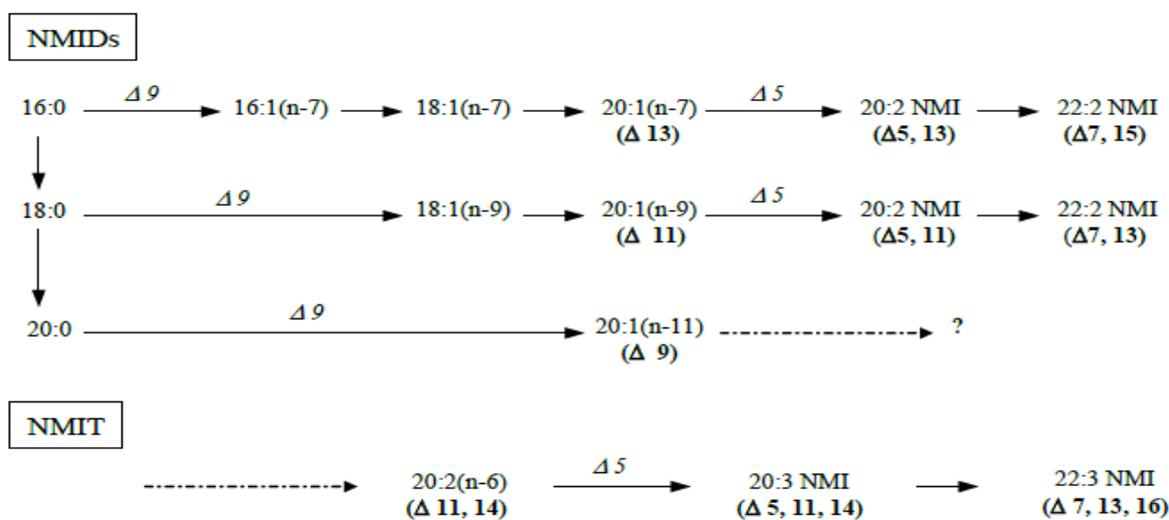


Figure 33. Biosynthèse des AG NMI et du 20:1n-11 (Kraffe, 2003)

III.6 .4. Biosynthèse des phospholipides

III.6 .4.1. Biosynthèse des diacylglycerophospholipides

Le point de départ de cette biosynthèse est le glycérol 3-phosphate formé essentiellement par réduction du dihydroxyacétone phosphate et, à un moindre degré, par phosphorylation du glycérol (Hatch et Choy, 2004) (Fig. 34).

L'acide phosphatidique (diacylglycérol 3-phosphate) est obtenu par deux acylations successives catalysées par un glycérol phosphate acyl transférase. La chaîne en position *sn-1* est généralement saturée et celle en *sn-2* insaturée. L'acide phosphatidique est un intermédiaire commun à la synthèse des phosphoglycérides et des triglycérides. Dans la synthèse des triglycérides, l'acide phosphatidique est hydrolysé pour donner du diacylglycérol, pouvant être réacylé en triglycérides par une diacylglycéride acyl transférase. La biosynthèse *de novo* de la PI commence par la formation de CDP-diacylglycérol (cytidine diphosphodiacylglycérol). Cette forme activée réagit avec l'inositol pour former la PI. La PC et la PE peuvent être synthétisés par une voie qui utilise la choline (alimentaire) et l'éthanolamine. La PS provient d'une réaction directe entre la PE ou la PC et la sérine. La PE peut être reformé par décarboxylation de la PS. La PC peut être également formée à partir de la PE par transméthylation. Les mollusques bivalves peuvent utiliser la biosynthèse *de novo*, mais ils ne seraient pas capables de décarboxyler la PS en PE (Shieh, 1968). Chez eux, la synthèse des glycérolipides se fait plutôt par le biais de transacylation à partir des lipides alimentaires que par biosynthèse *de novo* (Parker et Selivonchick, 1986).

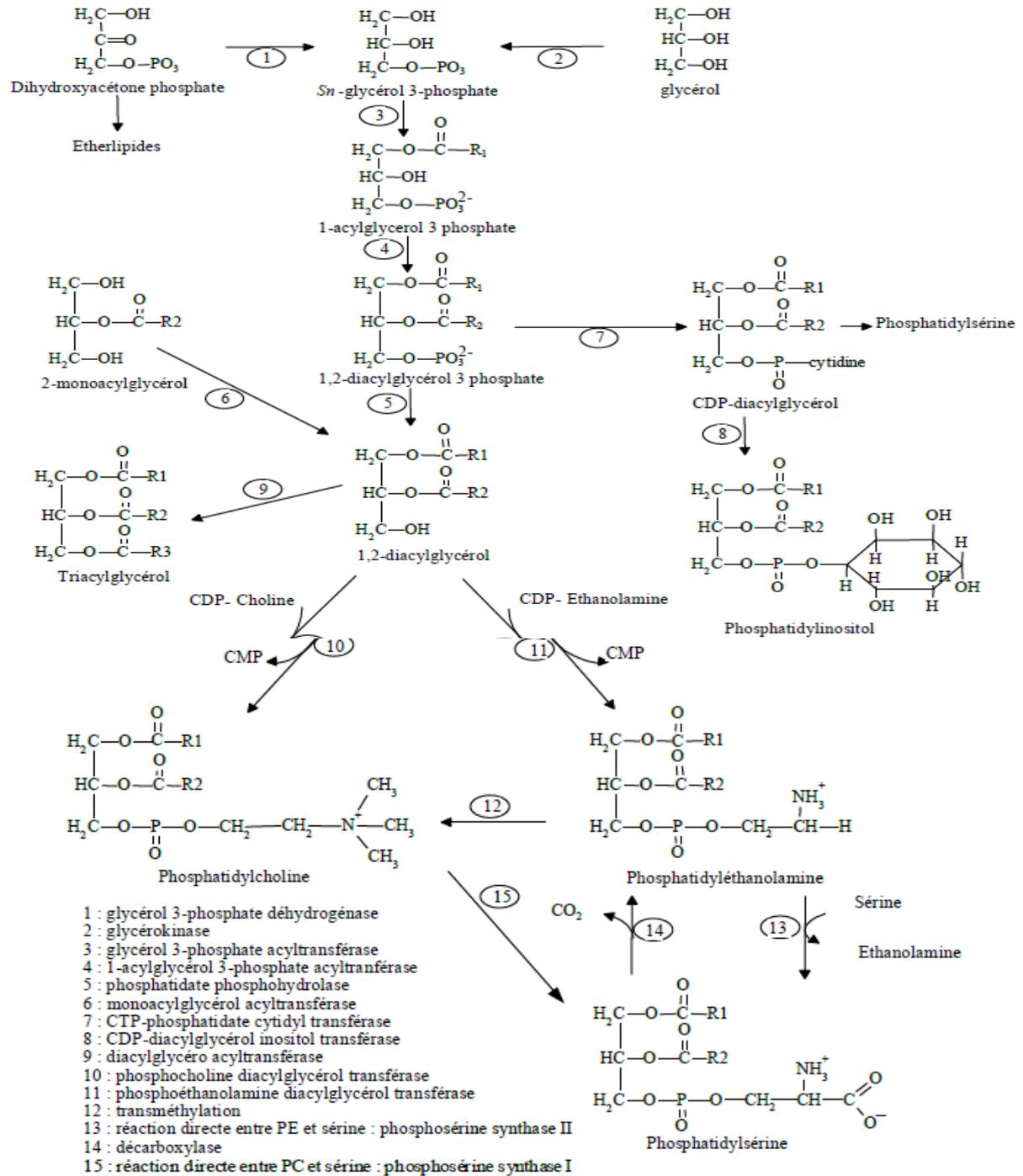


Figure 34. Biosynthèse des phospholipides (Hatch & Choy, 2004).

III. 7. Rôles biologiques et thérapeutiques des acides gras

Les fonctions des acides gras semblent être variées. A cet égard ils sont abondants au niveau des phospholipides membranaires des différentes cellules dont ils conditionnent leur fluidité (blond, 1993).

Une meilleure oxygénation des vaisseaux est assurée par une plus facile déformabilité des hématies. En effet, la fluidité des membranes biologiques est contrôlée par la structure des lipides qui les composent, et plus particulièrement par la nature et la quantité de leurs acides gras poly-insaturés. Plus déformables, elles s'insinuent mieux dans les microvaisseaux.

L'acide docosahexaénoïque C22:6 (n-3) (DHA) synthétisé à partir de l'acide α -linoléique est présent à des fortes concentrations dans la rétine, le cortex cérébral, le testicule et le sperme. Le (DHA) est particulièrement important dans le développement du cerveau et de la rétine chez le nouveau-né. Il serait fourni par le placenta et le lait (Murray *et al.*, 1999). En plus de leur rôle structural, les acides gras essentiels présentent un rôle biologique puisque l'acide arachidonique C20:4(n-6) est un précurseur des eicôsanoïdes comme les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les lipoxines.

Les eicôsanoïdes participent à de multiples fonctions de régulation et d'interrelation dans la cellule (Pascaud et Brouard, 1991). A l'heure actuelle des connaissances, les acides gras poly-insaturés (ω 3) à longue chaîne (EPA et DHA) présentent des effets préventifs sur les maladies cardiovasculaires.

Après l'analyse des acides gras du sang humain, Simon (1995) a montré que la présence des acides gras saturés est en corrélation positive avec le risque de maladie coronarienne, tandis que la présence d'acide gras de la série (ω 3) est en corrélation inverse. Toutefois, l'effet majeur des huiles de poisson est d'abaisser les triglycéroles du sang humain. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les maladies artérielles peuvent même être indépendantes du cholestérol, pour ne dépendre que des triglycéroles (en particulier chez les femmes). L'effet des huiles des poissons est alors de diminuer les triglycéroles liés aux VLDL (Very Low density protein) et aux chylomicrons. L'action est particulièrement nette chez les hypertriglycéridémiques et les femmes sous oestroprogestatifs. Dans ce sens, il a été constaté que l'alimentation japonaise traditionnelle, qui apporte peu de graisses mais de fortes quantités d'hydrates de carbone complexes et de poisson, peut être mise en relation avec le peu d'athérogenèse chez les femmes d'âge moyen (Okita, 1995).

Les acides gras polyinsaturés essentiellement l'EPA (l'acide eicosapentaénoïque) et le DHA (l'acide docosahexaénoïque) exercent des effets bénéfiques sur certaines formes de cancer (Karmali, 1989 ; Horrocks et Yeo, 1999). Plusieurs auteurs ont montré, en effet, une corrélation inverse entre la consommation de poissons et l'incidence de la mortalité par les différents types de cancer : cancer de pharynx et du larynx (Notani et Jayant, 1987), de l'œsophage (Ziegler *et al.*, 1981 ; Launoy *et al.*, 1998), de l'estomac (Hansson *et al.*, 1993), de pancréas (Barber *et al.*, 2001) et des poumons (Kimura, 2002). Les acides gras polyinsaturés essentiellement le DHA, exercent des effets bénéfiques sur d'autres pathologies. Il a été montré ainsi que la consommation du poisson et d'acide gras de la famille (n-3) protégerait l'homme contre l'emphysème et la bronchite chronique (Schwartz, 2000).

Les acides gras essentiels : notions et intérêts

Seuls les végétaux synthétisent les acides linoléique (18:2w6) et linolénique (18:3w3) qui doivent être apportés lors de l'alimentation animale.

Les animaux sont par contre capables de convertir les acides linoléique, linolénique, oléique (18 :1w9) et palmitoléique (16 :1w7) en 4 familles d'acides gras polyinsaturés. Les familles w6 et w3 sont dites essentielles du fait que les animaux supérieurs soient incapables de synthétiser leurs précurseurs et la synthèse de leurs dérivés est insuffisante. Les familles w7 et w9 ne sont pas considérées comme essentielles. Un rapport de la FAO reconnaît comme essentiels dans l'alimentation humaine les acides gras suivants : 18 :2 c w6, 18 :3 c w3, 20 :4 c w6 et 20 :5 c w3 (WHO/FAO. 1977).

Les recherches sur les AGPI se sont accrues depuis une dizaine d'années, depuis la découverte de leurs actions préventives et thérapeutiques sur de nombreuses pathologies. Ainsi, les w3 ont un effet bénéfique au niveau circulatoire dans la prévention et le traitement de l'artériosclérose, de la thrombose de l'hypertriglycémie (Barnerjee *et al.*, 1992) et comme régulateur de la pression sanguine (Mortensen *et al.*, 1988). Les w3 peuvent aussi intervenir dans le traitement des inflammations dues à l'asthme, l'arthrite, les migraines, le diabète, les fonctions immunes et le psoriasis (Kinsella, 1988 ; Bajpai et Bajpai, 1993). Généralement, ces acides gras interviennent en tant que précurseurs des eicosanoïdes, qui sont directement responsables des effets préventifs et thérapeutiques décrits ci dessus. Sous le terme générique d'eicosanoïdes sont regroupés les prostaglandines (PGa), les thromboxanes (TX) et les leukotriènes (LT).

Toutefois, les eicosanoïdes issus de l'AA et de l'EPA diffèrent structurellement et leurs effets physiologiques peuvent être antagonistes. Par exemple, la production du TXA2 dérivant de l'AA est inhibé par l'EPA, qui lui active la production du TXA3 (Yongmanitchai and Ward, 1989).

III. 8. Les activités biologiques des lipides

Le domaine pharmaceutique s'intéresse depuis toujours aux substances naturelles d'origine animale ou végétale. Peu d'espèces de la flore terrestre (moins de 10%) ont été étudiés fournissant 25 à 50% des molécules utilisées dans les médicaments actuels. Dans le domaine marin, la proportion de substances nouvelles ayant une activité biologique potentiellement intéressante serait au moins 100 fois supérieure à celle rencontrées chez les végétaux terrestres (Munro *et al.*, 1987 ; Flandroy, 1995).

Ainsi, le nombre de nouveaux métabolites marins présentant des potentialités thérapeutiques (molécules antitumorales, antibiotiques, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, ...) ne cessent de croître. D'autres secteurs industriels portent également de l'intérêt à ces molécules. Par exemple, c'est le cas de l'agroalimentaire (gélifiants extraits d'algues, supplémentation des aliments, ...), des matériaux (lubrifiants, colle, ...), de la navigation (antifouling) (Veylon, 1977 ; Hattori *et al.*, 1998 ; Haygood *et al.*, 1999 ; Holmström et Kjelleberg., 1999 ; Hellio *et al.*, 2000).

Tout comme les autres métabolites (sucres, protéines,...) les lipides présentent un intérêt potentiel dans tous ces domaines et particulièrement dans le secteur de l'activité biologique. Ainsi, Watkin *et al.* 2001 décrit un aperçu des activités des lipides et des acides gras sur la biologie et les fonctions cellulaires des os. De part ces particularités et notamment la richesse en AGPI, le milieu marin constitue une source intéressante de lipides bioactifs.

III. 8. 1. Activité antibiotique

Les activités antibiotiques regroupent les actions des métabolites telles que antibactériennes, antivirales, antifongiques, antialgales et prosticides. De nombreuses molécules lipidiques ciblant ces activités sont recensées.

Les produits actifs composés correspondent à des médicaments qui, complexés avec des lipides, voient leur activité augmenter.

III. 8. 2. Cytotoxicité et activité antiproliférative

- Un composé est dit cytotoxique quand il est actif contre des lignées cellulaires *in vitro*, et antitumoral quand cette activité cytotoxique est confirmée *in vivo*.

- L'efficacité d'un produit cytotoxique est mesurée par sa CI50 : concentration du produit qui inhibe la prolifération de 50% des cellules et plus rarement par sa CL50 : concentration qui tue 50% des cellules.

La recherche de molécules biologiques à activité antitumorale est sans doute la plus abondante. De nombreux lipides possèdent une telle activité, regroupant plusieurs classes lipidiques. Une supplémentation en AGPI induit une baisse de la cachexie des patients atteints d'un cancer du colon. De plus, ces acides gras (notamment les w3 et w6 EPA et GLA) possèdent une activité cytotoxique voire antitumorale sur les cellules de carcinome (Wigmore *et al.*, 1996, Kuratko et Becker, 1998). Des acides gras de la famille des w3 trouvés dans les algues marines, comme les acides octa- et hexadecatetraénoïque, sont capables de stopper la production des eicosanoïdes (Ishihara *et al.*, 1998).

Les sulfolipides ont montrés quant à eux leur action au niveau de l'inhibition de l'ADN polymérase a et b de mammifère, donnant ainsi lieu à une action antiproliférative sur des lignées de cellules cancéreuses humaines (Ohta *et al.*, 2000; Hanashima *et al.*, 2000).

Certains glycolipides peuvent aussi posséder une action antitumorale. C'est le cas notamment des glycolipides de source naturelle (Colombo *et al.*, 1998; Colombo *et al.*, 1999), par exemple les glycolipides d'éponge des caraïbes, les simplexides, isolés par Costantino *et al.* (1999) et possédant une activité antiproliférative sur les lymphocytes T. Une activité antiproliférative a aussi été montrée chez les glycolipides basés sur les céramides, les gangliosides (GM1, ...), dont l'augmentation d'unités d'acide sialique dans la molécule fait accroître l'inhibition de l'ADN polymérase a à l'inverse des unités de sucre (Simbulan *et al.*, 1994). Certains céramides naturels provoquent la fragmentation apoptotique de l'ADN induisant une mort de la cellule (Ji *et al.*, 1995). Enfin des phosphoglycolipides ont aussi été isolés de part leur activité antitumorale contre la leucémie (Hong *et al.*, 1991), ou du fait de leur action antiproliférative sur le facteur d'activation des plaquettes (Mickeleit *et al.*, 1998). L'activité antiproliférative potentielle de glycolipides peut aussi induire leur synthèse en laboratoire (Adar et Kaufman, 1991).

D'après la littérature, les lipides les plus actifs au niveau des actions cytotoxiques et antiprolifératives recherchés sont sans doute les phospholipides.

En effet, les phospholipides jouent des rôles divers dans le métabolisme cellulaire, notamment du fait de leur participation dans la composition de la membrane cellulaire. Le récepteur de la phosphatidylcholine, par exemple, est un signal de reconnaissance de l'apoptose. Et l'apoptose donne lieu à une redistribution des lipides membranaires (Arnoult *et al.*, 2001). Des analogues de l'acide phosphatidique sont des régulateurs des facteurs de croissance. Ainsi, LPA et le plasmalogène glycérophosphate induisent la prolifération cellulaire, alors que LPA cyclique inhibe cette prolifération (Fischer *et al.*, 1998). Un phospholipide issu d'un champignon (*Physarum polycephalum*) possède la capacité d'inhiber l'action de l'ADN polymérase a des cellules eucaryotes, transmise ainsi à ces dérivés synthétiques (Murakami-Murofushi *et al.*, 1992, Murakami-Murofushi *et al.*, 1995). Les dérivés des phospholipides sont aussi beaucoup étudiés, notamment les éther-lipides. Ce sont des composés non naturels, étudiés depuis que la lysophosphatidylcholine a démontré son rôle dans les mécanismes de défense (Arthur et Bittman., 1998).

La mitelfosine est reconnue pour avoir de nombreuses activités à finalité antitumorale ou cytotoxique. D'une manière générale, son action principale est son interférence avec les lipides membranaires (Berkovic *et al.*, 1995). En effet, son inhibition de la synthèse de la PC couplée à celle de la SM conduit à un effet antiprolifératif et à une apoptose des métastases cutanées et des carcinomes mammaires (Thaler *et al.*, 2000 ; Wieder *et al.*, 1998). Cette fonction antiproliférative est aussi démontrée pour les cellules de leucémie par l'inhibition de l'incorporation de la choline dans PC humaine (Boggs *et al.*, 1998 ; Unger et Eibl, 1991 ; Wang *et al.*, 1998). De la même manière que la mitelfosine, l'edelfosine induit une inhibition dose dépendante de la protéine kinase C sur des cellules de leucémie (mais la corrélation entre l'inhibition de l'activité enzymatique et l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses n'est pas mise en évidence) (Berkovic *et al.*, 1994). L'edelfosine, combinée à une prise de médicaments conséquente, induit aussi l'apoptose des cellules cancéreuses (Gajate *et al.*, 2000). D'autres éthers lipides possèdent cette activité, notamment l'ilmofofosine, qui induit un système dose et temps dépendent pour l'apoptose des lymphocytes T du sang humain (comme l'edelfosine) (Cabaner *et al.*, 1999), ainsi que des propriétés cytotoxiques et cytostatiques ces cellules cancéreuses phosphatidylcholine (méthyl PAF) qui possède une activité antinéoplastique contre les cellules de leucémie (Tsutsumi *et al.*, 1998).

III. 9. Qualité nutritionnelle des Mollusques bivalves

Il est admis que les produits marins constituent une source majeure d'acides gras polyinsaturés (AGPI).

Ces acides gras sont fortement liés à des mécanismes physiologiques et biochimiques indispensables et sont donc nécessaires aux fonctions vitales des organismes. Parmi ces AGPI, certains sont qualifiés d'acides gras essentiels car ils ne sont pas biosynthétisés par les organismes eux-mêmes. En effet, les AGPI essentiels proviennent principalement des microalgues et des différentes formes végétales marines.

A travers le réseau trophique, ces composés lipidiques sont incorporés dans les huiles des invertébrés marins et ceux des animaux marins plus évolués. Certains AGPI jouent plus spécifiquement un rôle de nutriments indispensables. Ce sont les AGPI des séries oméga 3 (ou n-3) et oméga 6 (ou n-6) dont le métabolisme conduit à la synthèse de dérivés à longues chaînes qui participent à la constitution des membranes cellulaires (rôle structural). Le métabolisme de ces AGPI conduit également à la synthèse de médiateurs bioactifs sous forme de molécules oxygénées (eicosanoïdes, docosanoïdes, etc.) (Guesnet *et al.*, 2005).

Les acides gras : oméga 3 constituent une famille dont le premier élément est l'acide alphalinolénique indispensable (ALA, 18:3 oméga-3). Les autres éléments, élaborés à partir de l'ALA, sont constitués de chaînes carbonées plus longues insaturées.

Les principaux AGPI n-3 étant l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C₂₀:5n-3) et le DHA (acide docosahexaénoïque, C₂₂:6n-3) (Bourre, 2004). Plusieurs auteurs ont signalé la richesse des bivalves en EPA et DHA (Freites *et al.*, 2002 ; Murphy *et al.*, 2002 ; Orban *et al.*, 2002 ; Su & Dinh, 2003 ; Zlatanov, 2008). Ces acides gras possèdent un rôle crucial dans la nutrition et la santé humaine. En effet, ils sont impliqués dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires (Hu & Willett, 2002 ; Harris & Von Schacky, 2004), possèdent des propriétés anti-inflammatoires et immunitaires (Calder & Grimble, 2002 ; Gil, 2002 ; Simopoulos, 2002) et jouent un rôle inhibiteur dans le développement de certains cancers tels que le cancer du sein, du colon et de la prostate (Leitzmann *et al.*, 2004 ; Roynette *et al.*, 2004 ; Binukumar & Mathew, 2005 ; Moyad, 2005 ; Judé *et al.*, 2006) (Fig. 35).

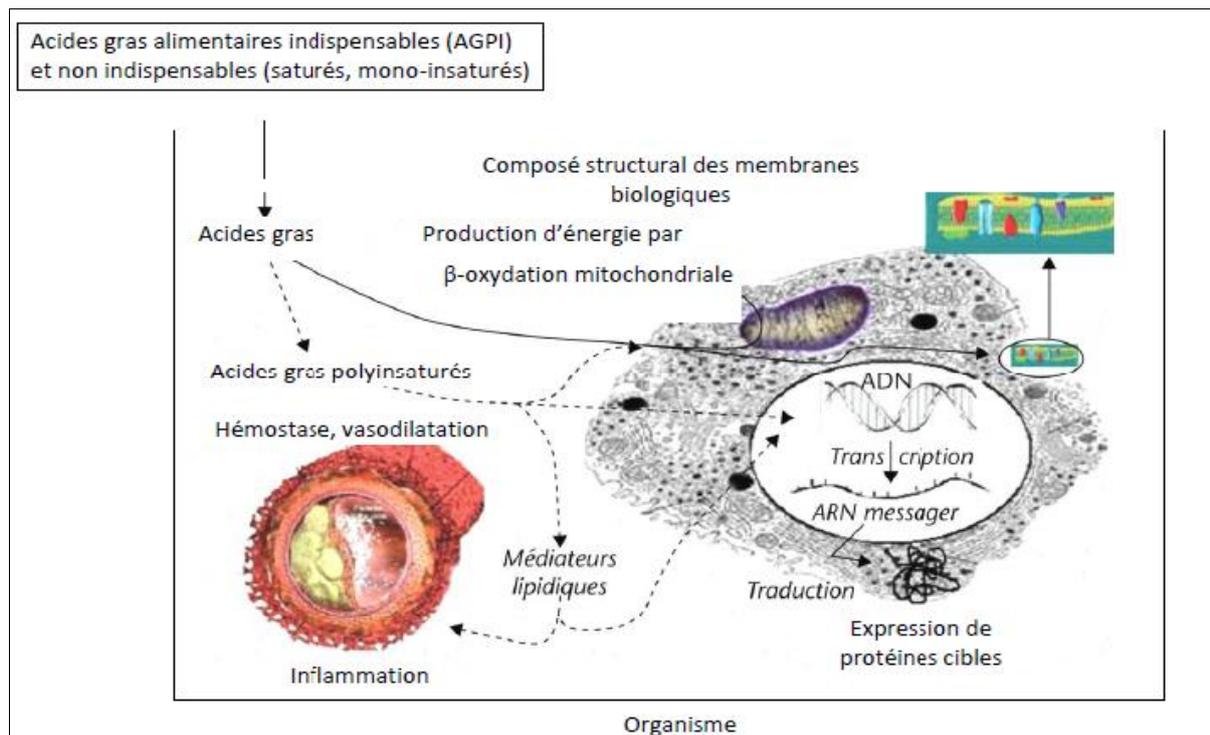


Figure 35. Principales fonctions exercées par les acides gras dans l'organisme humain (Guesnet *et al.*, 2005).

III. 10. Variation saisonnière de la composition biochimique des mollusques

La mobilisation et l'utilisation des substrats énergétiques (principalement les glucides et les lipides) est indispensable pour le maintien du métabolisme, la croissance et la reproduction de base d'un organisme, incluent les mollusques et et autres invertébrés (Gabott, 1983). En ce sens l'étude de la variation saisonnière de la composition chimique et du cycle annuel de reproduction a été largement utilisée comme un indicateur de la dynamique, de la structure et des périodes d'engraissement des populations naturelles et cultivées de mollusques bivalves. Par conséquent, les changements dans la composition biochimique (glucides, lipides et protéines) est très importante car elle permet de déterminer l'énergie destinée pour la croissance et pour la reproduction (Jayabal et kalyani, 1987 ; Navarro *et al.*, 1989).

La plupart des modifications métaboliques observées dans les tissus des mollusques bivalves sont principalement dues à des variations de la teneur en glucides (Principalement le glycogène dont le mode d'accumulation et d'utilisation reflète l'interaction complexe entre des facteurs exogènes tels que la disponibilité de la nourriture et de la température et les facteurs endogènes tels que la croissance et le cycle annuel de reproduction (Gabbott, 1976).

Les glucides jouent un rôle essentiel dans les cycles de l'énergie et de la reproduction des bivalves, tandis que les lipides servent de réserve énergétiques liées à la reproduction et au développement des gamètes (Zandee *et al.*, 1980 ; Martinez, 1991). En outre, il a été observé que les protéines constituent la source principale d'énergie pour maintenir l'organisme en cas de stress métabolique une fois que les glucides et des lipides ont été épuisés (Beninger et lucas, 1984 ; Hawkins et bayne, 1991).

Certains chercheurs ont pu confirmer que les variations de la composition biochimique des tissus de bivalves marins sont intimement liées à l'interaction de l'environnement (température, salinité, nourriture) comme facteurs exogènes et de la biologie de l'espèce (l'état reproducteur) comme facteur endogènes (Lodeiros *et al.*, 2001). A cet égard, plusieurs études ont rapporté que la disponibilité de la nourriture influe sur le cycle saisonnier de ces métabolites biochimiques (chez *Tellina tenuis* (Ansell et Trevallion, 1967) et *Donax vittatus* (Ansell, 1972), et est directement liée à la croissance et au cycle de reproduction. Néanmoins, il a été rapporté que les protéines ont aussi un impact direct sur le bivalve *Tapes philippinarum*, en tant que fournisseur d'énergie au cours de la période de faible disponibilité de la nourriture (Beninger et Lucas, 1984). D'autres études ont suggéré que les différences observées dans la composition biochimique de certaines populations de moules réparties dans les zones à différentes conditions environnementales, sont dues à la différence qualitatives et/ ou quantitative de la disponibilité de la nourriture d'origine phytoplanctonique (Okumus et Stirling, 1998).

PartieII

CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE, PRESENTATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES

A. Présentation du matériel biologique

I. Présentation de l'huître perlière *Pinctada radiata*

I.1. Taxonomie: Position systématique

La classification adoptée pour cette espèce est celle de Grassé (1998)



Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Sous-classe : Pteriomorpha

Ordre : Pterioida

Sous-ordre : Pteriina

Super famille : Pterioidea (Gray J.E, 1847)

Famille: Pteriidae (Broderir, 1839)

Genre: *Pinctada* (Roding, 1798)

Espèce : *radiata* (Leach, 1814)

Les huitres perlières et spécialement le genre *Pinctada* inclus des espèces largement distribuées dans l'océan tropical et subtropical. Etant donné que la morphologie et la morphométrie de la coquille change considérablement, il est alors préférable de les classifier selon la coquille. Ranson (1961) a réorganisé 11 espèces :

Pinctada albina (Lamarck, 1819),

Pinctada anomioides (Reeve, 1857),

Pinctada capensis (Sowerby, 1889),

Pinctada chemnitzii (Philippi, 1849),

Pinctada maculata (Gould, 1850),

Pinctada margaritifera (Linnaeus, 1758),

Pinctada martensi (Dunker, 1872) commune au Japon et renommé ultérieurement *P. fucata*

Pinctada maxima (Jameson, 1901),

Pinctada mazatlanica (Hanley, 1855),

Pinctada nigra (Gould, 1850) et
Pinctada radiata (Leach, 1814).

Classification

***Pinctada imbricata* Röding, 1798**

	Termes scientifiques (international)	Termes en français	Descriptif/ caractéristiques succinctes du groupe
Embranchement	Mollusca	Mollusques	Organismes non segmentés à symétrie bilatérale possédant un pied musculueux, une radula, un manteau sécrétant des formations calcaires (spicules, plaques, coquille) et délimitant une cavité ouverte sur l'extérieur contenant les branchies.
Classe	Bivalvia / Lamellibranchia / Pelecypoda	Bivalves / Lamellibranches / Pélécy-podes	Mollusques aquatiques, filtreurs, au corps comprimé latéralement. Coquille composée de 2 valves articulées disposées de part et d'autre du plan de symétrie. Absence de tête, de pharynx, de radula et de glande salivaire.
Sous-classe	Pteriomorphia	Ptériomorphes	Muscle adducteur postérieur développé, antérieur réduit.
Ordre	Pterioida	Ptérioides	Animaux à coquille en forme d'ailes, souvent inéquivalves. Charnière sans dents. Animaux fixés ou libres.
Famille	Pteriidae	Ptériidés	Charnière droite, ligament assez long, côté antérieur auriforme à cause de l'encoche byssale, intérieur fortement nacré, muscle adducteur médian.
Genre	<i>Pinctada</i>		
Espèce	<i>imbricata</i>		

En Australie, Hynd (1955) classifie la petite huître perlière *P.fucata* comme une espèce spécifique de *P.radiata*. Ranson (1961) la considère même comme synonyme. Basé sur une étude d'électrophorèse des protéines, l'huître perlière Japonaise *P. imbricata* est la même espèce que *P.fucata* et *P.radiata* (Colgan et Ponder, 2002), ces auteurs ont montré aussi que les noms de *Pinctada imbricata* (Røeding, 1798) et *Pinctada fucata* (Gould, 1850) ne représentent en réalité que des synonymies de l'huître perlière *Pinctada radiata* (Leach, 1814) puisque des similarités génétiques ont été prouvées en se basant sur l'étude de quatre loci (*Idh*, *G6pdh*, *Lap* et *Pgm*).

Une étude génétique sur les séquences ITS1 et ITS2 a été effectuée en Chine pour identifier les espèces du genre *Pinctada* et trouver par la suite une relation phylogénétique. Ces travaux ont conclu que *P.margaritifera* et *P.maxima* sont des espèces primitives. Par contre, *P. chemnitzii* est une espèce récente. La relation phylogénétique reste encore mal comprise. Le genre *Pinctada* a été alors subdivisé en deux grands groupes suivant l'absence ou la présence des dents de la ligne charnière. La section I regroupe les deux plus grandes espèces *P.maxima* et *P. margaritifera* sans dent de charnière. Le groupe II regroupe les plus petites et montrant des dents de charnière (Yu et Chu, 2006-a).

D'après les récentes recherches, beaucoup d'espèces endémiques de *Pinctada* sont considérées synonymes d'une espèce cosmopolite (Shira, 1994). Cependant, la classification exacte n'est pas définie. Il est clair que *P.imbricata* = *P.fucata* = *P. radiata* = *P.martensii* (Yu et Chu, 2006-b).

I.2. Noms vernaculaires

P.radiata est appelée communément et selon la langue en :

- Anglais: Rayed Pearl Oyster et small pearl oyster (Colgan et Ponder, 2002)
- Français: Pintadine radiée
- Arabe : Mahar

Tout au long du littoral tunisien, on a remarqué une grande diversité des noms attribués à ce bivalve. Selon les régions, il prend le nom de :

Zhuitre : à la Marsa

Mahar et Sdaf : dans les régions Nord et Est

Rikilli : de Sfax à Gabès

Snadak et Chahhar : dans les îles Kerkenneh

Gardèch : à Djerba

I.3. Morphologie et caractère distinctif

Il s'agit d'un mollusque bivalve. L'animal possède un exosquelette rigide pour le protéger des conditions défavorables et des prédateurs. Cette coquille montre une forme oblique et est de couleur variable chez les Ptéridés (Yu et Chu, 2006-b). Les deux valves sont unies par un ligament abducteur (conchyoline) et deux muscles adducteurs souvent inégaux. Elles sont articulées dorsalement, par une charnière où les dents d'une valve pénètrent dans les fossettes de l'autre valve. La symétrie des valves est altérée chez les bivalves collés au substrat ou posés sur le fond ; une des valves est alors bombée. Généralement, la valve gauche est un peu plus convexe que la droite, ils sont inéquivalents. L'oreille postérieure montre une large expansion allongée et étroite. Alors que l'oreille antérieure constitue une forme plus au moins triangulaire (Checa et Rodriguez-Navaro, 2005). La coquille est munie d'un byssus qui permet sa fixation sur les substrats. La surface externe de la coquille est souvent écailleuse et les crochets sont petits et peu saillants, séparés par un aréa cardinal étroit portant en arrière de ceux-ci un ligament externe plus ou moins développé. L'intérieur de la coquille est fortement nacré, avec souvent une bordure de teinte plus sombre ventralement.

La coquille des mollusques est formée de trois couches qui se superposent. La couche externe ou Périotrancum est essentiellement organique. La couche intermédiaire, appelée aussi Mésostrancum, est composée de prismes calcaires. Alors que la couche interne, l'endostrancum est la couche nacrée (Checa, 2000).

La surface externe des coquilles adultes est lisse et couverte d'une multitude d'espèces. On trouve généralement les éponges, les bryozoaires, les algues...par contre, la coquille des individus jeunes est couverte de lamelles calcaires, aplaties et se terminant par des squamules arrangées suivant des rangées radiales. Ces lamelles correspondent aux sites d'accroissement.

I. 4. Anatomie

Le corps de ce bivalve est doté d'un certain nombre d'organes indispensables dans les fonctions physiologiques de l'animal : digestion, respiration, reproduction.

Le corps est formé par (Fig 36 et 37):

- Le manteau : c'est une feuille de tissu conjonctif qui recouvre l'ensemble du corps mou de l'huître, cette feuille comprend des muscles, des vaisseaux sanguins, des nerfs et elle est recouverte d'un épithélium unicellulaire.

Le manteau joue un rôle de premier ordre dans la formation de la coquille et la sécrétion du ligament, il intervient également dans la formation de perles par stimulation de la sécrétion nacrière suite à la pénétration d'un corps étranger quelconque vivant ou mort (grain de sable, détritrus, parasite...) dans son épaisseur (Fisher, 1950 ; Besnard, 1948).

- Les muscles adducteurs : relient les deux valves et permettent l'ouverture et la fermeture de la coquille. Le muscle adducteur postérieur est développé alors que l'antérieur est atrophié.
- L'appareil respiratoire : est constitué d'une paire de branchies ciliées disposées, de chaque côté du corps, entre les lobes du manteau. Ces cils battent tous dans une direction précise faisant circuler l'eau au contact du corps.

Les particules alimentaires enrobées dans du mucus sont introduites dans le tube digestif par ce mouvement ciliaire.

- L'appareil digestif : comprend une bouche limitée par les deux lèvres et entourée de deux paires de palpes labiaux de 4 à 5mm de longueur assurant la filtration de l'eau et la capture du microplancton. Cette bouche s'ouvre directement dans un œsophage très court conduisant les aliments jusqu'à l'estomac ; ce dernier est entouré d'une masse tissulaire, le foie qui se poursuit par un intestin. L'anus s'ouvre en dessous du muscle adducteur postérieur dans le plan méridien (Beaumont et Cassier, 1998).
- L'appareil reproducteur : est formé d'acini très ramifié et est situé contre le muscle adducteur. La couleur et le volume des gonades et des glandes génitales varient en fonction du stade de maturité sexuelle. En période d'émission gamétique, les glandes sexuelles peuvent envahir le volume total de la masse viscérale jusqu'à la base du pied, A ce stade, les teintes sont plus nettes, la gonade mâle possède une couleur blanche crème et celle de la femelle est de couleur orange vif (Tlig-Zouari, 1993).
- L'appareil circulatoire : est ouvert, le sang de l'huître est incolore et constitué de deux groupes de cellules : les cellules hyalines et les cellules granuleuses.

- Le système nerveux : est peu développé, formé de trois paires de ganglions : cérébro-pleuraux, pédieux et viscéraux, reliés entre eux par des connectifs (Beaumont *et al.*, 2004).
- Le système excréteur : est formé par les organes de Weber qui filtrent le sang et rejettent les déchets métaboliques dans le péricarde.
- Le pied : est l'organe locomoteur ; il est atrophié et muni d'une glande byssogène qui secrète le byssus (filament glycoprotéique) assurant la fixation de la coquille à son substrat.

1. bouche
2. rebord labial
3. pied
4. gonade
5. branchie
6. coquille
7. manteau
8. muscle adducteur
9. anus
10. intestin
11. coeur
12. glande intestinale
13. ligament
14. estomac

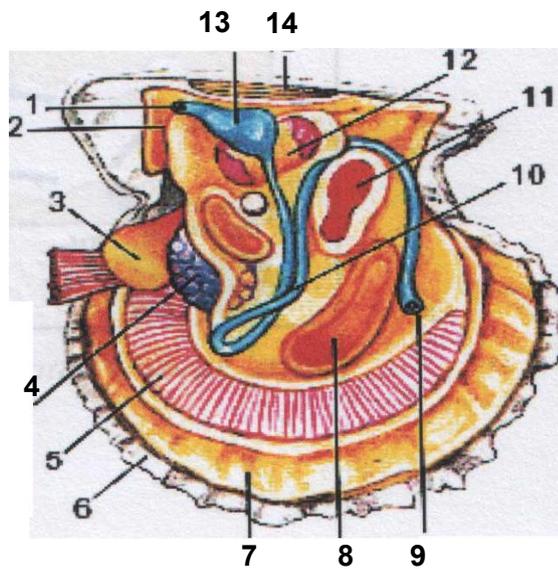


Figure 36. Anatomie de *Pinctada radiata* (Gervis & Sims, 1992).



Figure 37. Coquille ouverte montrant la chair de *Pinctada radiata* (Lieu de collecte Maharès). Photo : Rym Ben Ammar.

I.5. Répartition géographique et bathymétrique

I.5. 1. Répartition géographique

I.5. 1. a. Dans le monde

L'huître perlière *P.radiata*, d'origine indopacifique, se caractérise par une large distribution géographique dans le monde. Cette espèce est rencontrée sous les tropiques, en mer Rouge (Lamy, 1929), dans le golfe Persique (Jameson, 1901), le golfe de Suez (Fisher, 1865), le golfe de Mannar (Prashad et Bhaduri, 1933), le golfe de Mexique (Lamarck, 1836), aux îles Maldives, au Japon (Jameson, 1901), la Somalie (Gruvel, 1931), près de Madagascar, à Ceylon dans le sud de l'Inde, en Malisie, en Nouvelle Guinée, en Afrique du Sud, en Australie et en Nouvelle Zélande (Tomlin, 1927), en Nouvelle Calédonie (Lamy, 1932), aux Bermudes, aux Antilles (signalée sous le nom d'*Avicula flabellum*), à Cuba et au Brésil (Ranson, 1961) (Fig. 38).

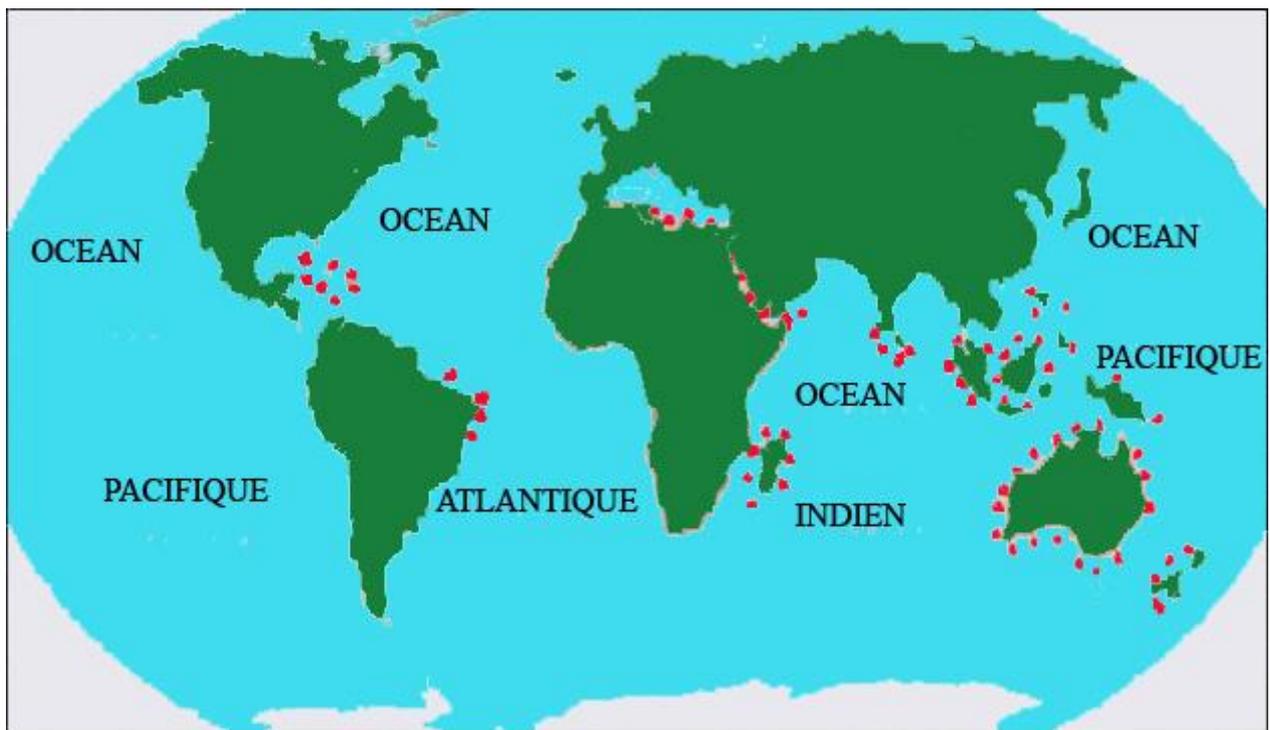


Figure 38. Répartition géographique mondiale de *P.radiata*

I.5. 1. b. En Méditerranée

La présence de la Pintadine en Méditerranée est récente. Signalée depuis 1811 en Alexandrie par Saving, elle n'a pu gagner de nouveau terrain vers l'occident qu'après l'ouverture de canal de Suez en 1869.

La voie d'introduction n'est pas encore déterminée avec exactitude : elle aurait pu se faire soit par pénétration progressive favorisée par un stade larvaire pélagique de trois semaines (Herdman et Hornell, 1903), soit par le trafic maritime et la mariculture (Zibrowius, 1992) ou bien par la migration de certaines espèces telles que, la tortue marine (*Caretta caretta*) à laquelle elle adhère sur la carapace (Oliverio *et al.*, 1992).

Cependant, Di Monterosato (1899), voit mal l'aptitude de cette espèce à parcourir en 30 ans, un chemin aussi long et de réussir à franchir les diverses barrières écologiques et géographiques pour se trouver enfin avec une abondance très élevée surtout dans le golfe de Gabès. Par conséquent, il remet en doute l'idée de la migration Lessepsienne et pense qu'il s'agit plutôt d'une espèce indigène à la Méditerranée.

Pinctada radiata a colonisé tout le bassin oriental et toutes les côtes de la rive sud de la Méditerranée, sauf celle de l'Algérie et du Maroc. En effet, elle était signalée en Tunisie en 1891 par Bouchon-Brandely et Berthoule, en Syrie, à Chypre (Di Monterosato, 1899), à Malte (Pallary, 1912), au Liban (Gravel et Moazzo, 1931), en Grèce : à Saronikos (Serbetis, 1963), en Turquie (Kinzelbach, 1965), à Lampedusa (Bombace, 1966), à Pantellaria (Sabelli, 1969), en Libye et Israël (Barash et Danin, 1972) et en Sicile (Di Natale, 1982) (Fig.39).

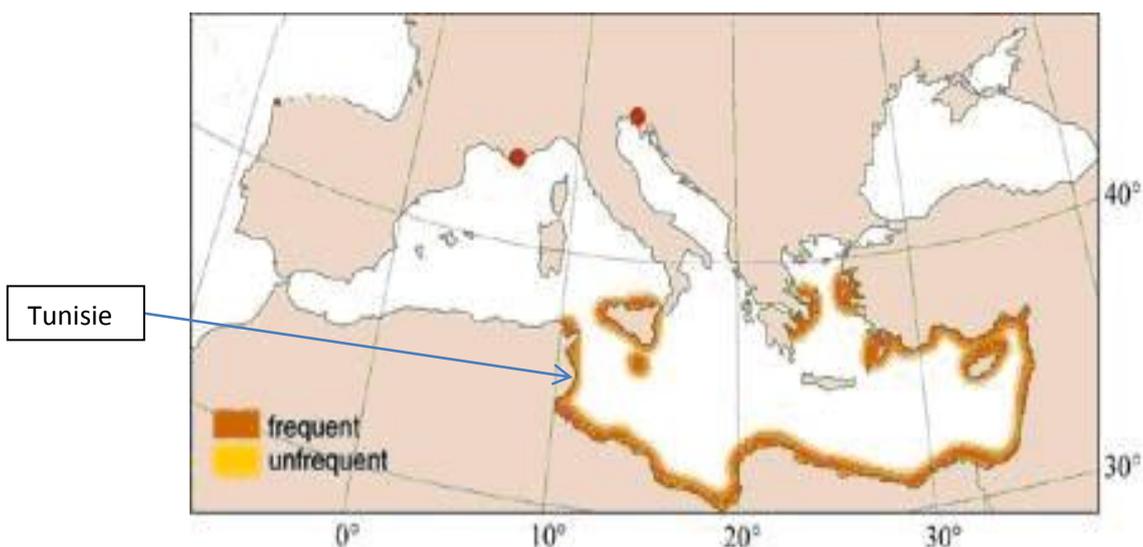


Figure 39. Répartition de *Pinctada radiata* en Méditerranée (Zenetos *et al.*, 2003)

I.5. 1. c. En Tunisie

Pinctada radiata a été signalée pour la première fois dans le golfe de Gabès à Djerba en 1891 par Bouchon-Brandely et Berthoule. Dans ce golfe, elle pénètre largement dans la partie nord-occidentale de la lagune de Bougrara (Zaouali, 1978) proche de Djerba mais assez paradoxalement, elle est totalement absente dans la lagune voisine des Bibans du côté de Zarzis (Zaouali et Baeten, 1985). Cependant, d'autres travaux tels que ceux de Seurat (1929) ont montré que cette espèce vient de coloniser le canal de Sidi Bou Harouch de la mer des Bibans, séparant l'îlot de Sidi Chaouch et l'îlot de Sidi Bou Harouch. Vassel (1899) a signalé la présence de la Pintadine au niveau de l'embouchure de l'oued Melleh, sur la côte occidentale de Djerba et à Sfax.

Cette espèce est abondante dans le golfe de Gabès, notamment au niveau des îles Kerkennah et elle se raréfie avec une présence qui devient sporadique dans le golfe de Tunis (Zouari, 1985).

Dans le secteur nord et nord-est de la Tunisie, Ktari-Chakroun et Azouz (1971) ont pu récolter des spécimens vivants au large de Kelibia et au nord est de l'île Cani.

Plus récemment, Mejri (2004) a signalé la présence de ce bivalve au niveau de Hergla et du littoral nord de Sousse. Irathni (2006) a montré que *P.radiata* se présente sur la quasi-totalité du littoral nord et est de la Tunisie avec des densités différentes et la lagune de Bizerte constitue la limite méridionale de la distribution de cette espèce. En effet, elle est totalement absente au niveau de littoral de Tabarka et des côtes de Bizerte.

I.5. 1. d. Répartition bathymétrique et habitat

P.radiata est une espèce benthique sessile. Elle vit fixée par son byssus sur divers substrats. Dans le golfe de Mannar elle fréquente les fonds rocheux, détritiques et coquilliers plus ou moins consolidés (Ranson, 1961). Dans le golfe de Gabès, elle se rencontre sur des plages de sable légèrement vaseux et se fixe également sur divers substrats tels que les rochers, bouées, chaînes, coquilles de bivalves, rhizomes et thalles de végétaux (Seurat, 1929).

Selon Fisher *et al.* (1987), la Pintadine fréquente les fonds détritiques variés de l'étage médiolittoral depuis la zone littorale jusqu'à 150m de profondeur. A Ceylan et dans le golfe persique, elle se développe surtout sur les fonds de 5 à 25m (Ranson, 1961).

En Tunisie, cette espèce est rencontrée de 0 à 40m (Zouari, 1985). Cependant, la colonisation des eaux de profondeur supérieure à 20m paraît rare dans le golfe de Gabès (Ktari-Chakroun et Azouz, 1971).

I.5. 1. e. Intérêt écologique

L'huître perlière, *P.radiata*, d'origine indopacifique compte parmi les premiers immigrants invasifs arrivés en Méditerranée suite à l'ouverture du canal de Suez. Ses mécanismes d'adaptation ainsi que son pouvoir d'élargir son aire de répartition présentent un intérêt scientifique majeur.

Cette espèce est dotée d'une grande résistance et peut supporter des conditions extrêmes. En effet, à marée basse, la pintadine peut rester à sec et à fortes températures pendant quelques heures. Seurat (1929), a affirmé qu'il a reçu des échantillons de *Pinctada* vivantes ayant effectué un voyage de six jours à sec (de Djerba à Alger), sans aucune précaution.

Ce bivalve filtreur résiste également à la pollution marine: c'est une espèce bio-indicatrice qui peut être de ce fait utilisée dans les programmes de bio-surveillances. Dans ce cadre, plusieurs travaux ont été menés sur l'accumulation des métaux traces (ou lourds) dans la chair de *P. radiata*. Afin d'évaluer la contamination de l'environnement marin au Koweït suite à la guerre du Golfe de 1991, Bu-Olayan et Subrahmanyam (1997) ont déterminé les concentrations du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du plomb (Pb) et du zinc (Zn) dans le tissu mou de la Pintadine provenant de trois stations côtières pendant la période 1990-1994.

Al-Madfa *et al* (1998) ont montré que ces huîtres sont capables de concentrer des polluants à plusieurs ordres de grandeur au-dessus des niveaux enregistrés dans l'eau de mer.

II. Présentation de la nacre de l'huître perlière *Pinctada radiata*

Rappelons que la coquille de *P.radiata* est formée de trois couches :

- Le périostracum : une fine couche organique
- Le mésostacum : c'est la couche calcitique
- L'endostracum ou nacre qui représente la couche aragonitique (Fig. 40).

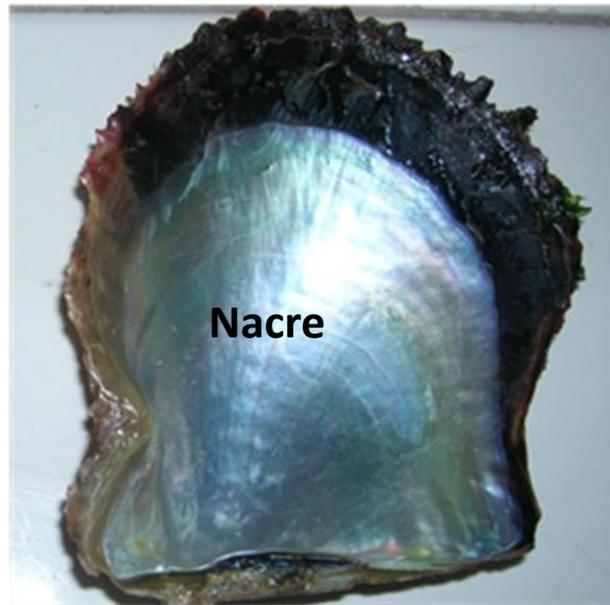


Figure. 40 Face interne de la coquille de *Pinctada radiata*

Afin de valoriser cette espèce, nous nous sommes intéressés particulièrement à sa nacre en tant que substitut osseux. Le problème se pose alors sur la qualité de nacre de différentes stations des côtes tunisiennes.

Dans une étude précédente dans le cadre d'un projet dans le but de comparer les caractéristiques morphologiques de la coquille et la structure des populations tunisiennes de l'huître perlière *Pinctada radiata*, 27 stations, de Bizerte à Zarzis, dont la profondeur varie entre 0 et 39,3 m ont été prospectées.

III. Produits chimiques et réactifs

Acide ascorbique, SIGMA Aldrich

Acide picrique

Alcool absolu (Prolabo) est dilué à 70° et 95° dans de l'eau distillée

Aliquots SYBER Green

Aliquots RNase et DNase Free

Amorces

Azote liquide

PCR, (QIAGEN®)

Bleu trypan, SIGMA

Bleu Alcian, Blue-tetrakis (methylpyridium) chloride sont fournis par Sigma Aldrich

Bloc froid (ou cooling)

DMEM F12, α MEM, GIBCO

(INVITROGEN)

DMSO, (dimethyl sulfoxyde, FISHER BIO REAGENTS)

DNase, QIAGEN

Eau millipore

Eau RNase free	PS (Pénicilline, Streptomycine, 100µg/ml), INVITROGEN
Ethanol, SIGMA	Sélénite de Na ($3 \cdot 10^{-5}$ M, 10mg/ml)
Glutamine, INVITROGEN	Rouge Alizarine ou L'Alizarin Red S (Sigma Aldrich)
βGlycérophosphate, SIGMA Aldrich	Rouge Sirius Solution d'acide picrique à 0,1% : acide picrique (réf. 20.642, Prolabo, France)
Hcl, PROLABO	SVF, (Sérum de Veau Fœtal) (Dutscher)
Insuline (10mg/ml), SIGMA	Triton 100x
Hydroxide d'ammonium 0.1%	Trypsine, GIBCO (INVITROGEN)
Méthanol, MERCK	Transférine(10mg/ml).
MTT (Bromure de 3 – [4,5- diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl- tétrazolium) (Sigma).	
B-mercaptoéthanol	
PBS, (Phosphate Buffered Saline, Eurobio)	

III. 1. Kits.

Kit de d'extraction et de purification des ARN « RNEasy Mini Kit » : QIAGEN

Kit de transcription reverse «Kit M-MLV» : INVITROGEN

kit test LDH (Roche, ref 11-644-793-001)

III. 2. Matériels.

Autoclave	Hématocytomètre de Malassez
Balance de précision	Hotte à biologie moléculaire, AIRLAB
Ballon 100ml +support	Hotte pour culture cellulaire
Centrifugeuse	Incubateur
Congélateur(-20, -80°C)	Lamelles thermanox®, VWR
Cryobox, Cryotube	Lecteur de microplaque
Eprouvette 100ml	Light Cycler, capillaires et bloc froid
Entonnoir	Lyophilisateur CHRIST ALPHA 1-2 LD
Falcons 50ml	Lecteur de microplaques, LABSYSTEMS
Filtres 0,22 µm, MILLIPORE, LIFSCIENCE	Mastercycler Gradient, EPPENDORF
Flasques, T25 et T75	Micropipette et cône
	Microscope optique

Nano-Drop

Pipettes pasteur, 5,10, 25ml

PHmètre, ORION

Parafilm

Plaques, 12, 24, 96 puits (Corning, stérile)

Seringues, ACRODISC ou LIFSCIENCE

Spatule

Spectrophotomètre

Tube à colonne, Eppendorfs, Verrerie.

IV. *Pinctada margaritifera*

L'huître perlière à lèvres noires *Pinctada margaritifera*, a été découverte par Linné en 1758. Elle mesure 15 à 25 cm pour un poids de plus de 5 kg, vit à 5-30 mètres de profondeur dans les mers chaudes et a une longévité moyenne de 15 ans mais peut vivre jusqu'à 30 ans. Sa classification est la suivante :



Figure 41. Face interne et externe de la coquille *Pinctada margaritifera*.

Règne : animal

Embranchement : mollusque

Ordre : Pteriida

Sous ordre : pteriina

Classe : Bivalvia

Sous classe : pteriomorphia

Super-famille : Pterioidea

Famille : *Pteriidae*

Genre : *Pinctada*

Espèce : *margaritifera*

Variété 1: *cumingii* ou **Variété 2:** *galsofii*. (Lindner, 2005)

La production polynésienne de perles basée sur la culture de l'huître perlière à lèvres noires, *Pinctada margaritifera*, est la plus grande industrie d'exportation en Polynésie Française. Cette huître perlière, sécrétant naturellement des pigments noirs donnant cette teinte si caractéristique à sa nacre et à ses perles, est présente dans les lagons des atolls polynésiens.

IV. 1. La nacre de *Pinctada margaritifera*

La nacre a une structure interne hautement organisée, chimiquement complexe, avec des propriétés mécaniques et des effets optiques qui créent un bel éclat brillant caractéristique.

Le principal composant structurel de la nacre mature est une tablette pseudo-hexagonale constituée principalement d'aragonite, un polymorphe de carbonate de calcium. Les tablettes de nacre sont organisées en couches dans lesquelles chaque tablette est en contact physique avec sa voisine et séparée uniquement par une matrice intertabulaire constituée principalement de protéines et de carboxylates. Les couches individuelles de tablettes sont séparées par des couches constituées principalement de chitine et matériel organique, c'est la matrice interlamellaire (Rousseau *et al.*, 2009).

La matrice organique est continue dans les tablettes de nacre contrairement à la phase minérale qui est finement divisée. Elle est composée de chitine, polysaccharides, protéines, peptides, lipides et d'autres petites molécules de moins de 1000 Da. Ces molécules organiques peuvent être extraites avec des solvants aqueux ou organiques (Rousseau *et al.*, 2007).

La poudre de nacre est obtenue par ponçage de la coquille puis la nacre est cassée en morceaux et ensuite réduite en poudre et enfin des molécules sont extraites.

La nacre n'est pas toxique, n'entraîne pas de réaction inflammatoire, ni la formation de fibres. Elle est résorbable et cette résorption induit la formation de l'os normal *in vivo*. Dans ce qui suit nous allons donc comparer les extraits ESM de cette nacre avec celle de *Pinctada radiata* ainsi que ses extraits lipidiques.

V. Les cellules étudiées

V. 1. Les ATDC5

Les ATDC5 sont les cellules de la lignée cellulaire pré-chondrogénique dérivant de tératocarcinome AT805 (isolée des cellules souches AT805) de Souris.

Ces cellules ont la capacité de se différencier en chondrocytes lorsqu'elles sont en présence d'insuline. Les cellules ADTC5 présentent une morphologie arrondie et synthétisent du CSPG (cartilage-specific proteoglycan) et du collagène de type II qui sont caractéristiques des chondrocytes. Les cellules ATDC5 sont capables de se différencier en chondrocytes à une fréquence élevée.

Dans les conditions de culture appropriées, les cellules ATDC5 hypertrophiques initient un dépôt minéral. Les cellules ATDC5 sont le premier exemple d'une lignée de cellules souches préchondrogénique qui fournit une excellente minéralisation en culture *in vitro* sans supplément de β -glycérophosphate et offre une occasion d'analyser le mécanisme moléculaire de minéralisation du cartilage. (Shukunami *et al.*, 1997)

Ainsi cette lignée de cellules est souvent utilisée pour les études cellulaires et moléculaires de la différenciation chondrogénique. Cette lignée est un bon modèle validé permettant de mieux comprendre la différenciation chondrocytaire (Atsumi *et al.*, 1990). Les ATDC5, la lignée cellulaire de chondrocytes, seront cultivées en micromasse afin de faire un essai *in vitro* (où les cellules seront dans des conditions qui se rapprochent de celles *in vivo*). et avec un inducteur l'insuline.

V.2. Les MC3T3

Les pré-ostéoblastes MC3T3 est une lignée ostéoblastique murine immortalisée capable de se différencier en ostéoblaste minéralisant, ce sont des ostéoblastes murins qui possèdent la capacité de se différencier en ostéocyte sous l'effet de l'acide ascorbique et de former alors une matrice minérale en présence de 3 à 4 mM β -glycérophosphate dans le milieu de culture (Wang, Christensen *et al.*, 1999). Ces cellules seront un modèle utilisé pour caractériser le pouvoir ostéogénique des extraits (extraits lipidiques et ESM) et ainsi prouver la stimulation des phases terminales de la différenciation ostéoblastique.

VI. Les inducteurs

Les milieux de différenciation contiennent des facteurs de croissance spécifiques du lignage d'intérêt. Dans le cas du lignage ostéogénique, plusieurs facteurs biochimiques sont connus pour orienter les cellules souches mésenchymateuses vers la différenciation ostéoblastique. La méthode classique d'induction de la différenciation ostéoblastique consiste en un milieu de culture contenant une combinaison de dexaméthasone, de β -glycérophosphate et d'acide ascorbique pendant plusieurs semaines.

VI. 1. Le β -glycérophosphate (β GP)

L'utilisation de β GP permet la formation d'une matrice extracellulaire minéralisée, car il constitue un substrat de choix pour activer en particulier la phosphatase alcaline (PAL) des cellules mésenchymateuses (Chang *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 1992). De façon générale, le β GP est utilisé dans le milieu de différenciation ostéogénique des MSCs (Cellules Souches Mésenchymateuses) de 5 à 10 mM (Hildebrandt *et al.*, 2009).

VI. 2. L'acide ascorbique (AA)

Il joue également un rôle important dans la synthèse de la matrice extracellulaire et de façon précise sur l'hydroxylation des résidus proline et lysine du collagène, principal composant de la MEC (Prockop et Kivirikko, 1995 ; Royce, 2003 ; Takamizawa *et al.*, 2004). Des études montrent que l'addition d'acide ascorbique dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la synthèse matricielle, tandis que l'absence d'acide ascorbique conduit le plus souvent à la réduction de l'expression de la PAL et à l'inhibition de l'accumulation de calcium (Fernandes *et al.*, 2010).

B.Méthodes utilisés

I. Echantillonnage et suivi saisonnier

I.1. Situation géographique

S'étalant sur presque 750 km de côte, la région sud de la Tunisie représente plus que la moitié des côtes tunisiennes. Cette région est formée par le golfe de Gabès et s'étend de Ras Kapoudia au niveau du parallèle 35°N jusqu'à la frontière tuniso-lybienne (Fig.42).

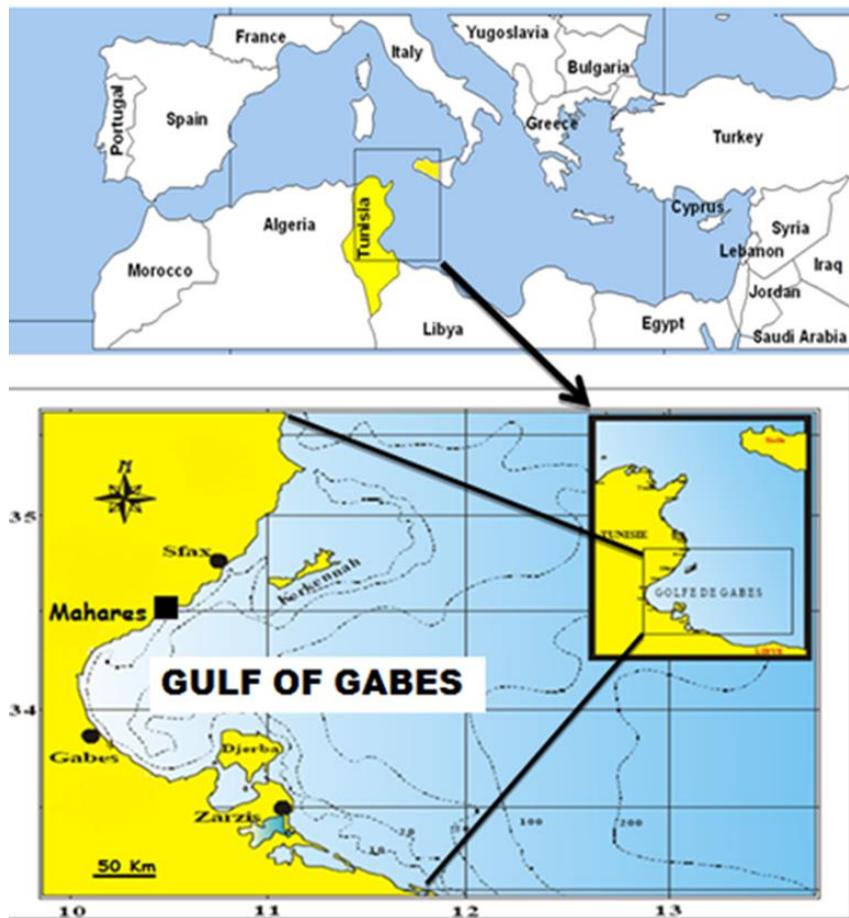


Figure. 42 Situation géographique du site d'échantillonnage de l'huître perlière *Pinctada radiata* : Maharès (■) au niveau du golfe de Gabès.

I.2. Echantillonnage

Les échantillons de l'huître perlière *Pinctada radiata* ont été collectés au niveau de la région de Maharès à l'aide du navire océanographique HANNIBAL moyennant le chalut benthique. Pour les besoins de l'étude biologique, Les prélèvements ont été réalisés suivant les saisons au hasard, à raison de 60 individus par saison, soit un total de 240 individus de *Pinctada radiata* dans la station de Maharès. Après retrait de leur milieu naturel, les pintadines ont été mises dans des placières avec de l'eau de mer.

Le tableau (III) présente la date d'échantillonnage, les coordonnées et la profondeur de la station de collecte de *P. radiata*.

Table III. Localité et données biologiques de l'huître perlière *P. radiata* à Maharès.
Resultats exprimés en moyenne \pm SE ($n = 6$).

Localité		Profondeur (m)		Replicate Animals (n)	Salinité (p.s.u)	Temperatures (°C)	Dates	Longueur (cm)	Largeur (cm)	poids (g)					
Début	Fin	Début	Fin	6	36,6-39,7	16-18	Février 26,2011	8.7 \pm 0.57	7.83 \pm 0.42	106.25 \pm 7.26					
34°25',818N 10°58',91E	34°26',661N 11°03',080 E	19.6	21.2								19-20	Mai 15,2012	8.57 \pm 0.29	7.55 \pm 0.28	88.37 \pm 7.84
											22-27	Aout 26,2012	5.65 \pm 0.27	4.42 \pm 0.22	38.51 \pm 4.91
											22-25	Novembre 19,2012	6.4 \pm 0.12	5.48 \pm 0.11	54.76 \pm 3.09

II. Qualité de la nacre

l'extraction de la nacre est d'autant plus facile et rentable que l'épaisseur de la couche de nacre est plus importante. Une étude de l'épaisseur de la couche nacrée de l'huître perlière *P. radiata* de 10 populations du littoral tunisien a été réalisée (Bellaj *et al.*, 2011).

l'épaisseur de la couche de nacre est différente d'un endroit à un autre. En effet, l'épaisseur maximale de cette couche est observée au niveau de la charnière. En allant de la charnière vers le bord non nacré, cette épaisseur diminue progressivement.

Nos travaux montrent une bonne qualité de nacre à Maharès entre autre les échantillons de Maharès présentent la meilleure épaisseur de nacre. Ces résultats ne font que confirmer les résultats trouvés par Bellaj *et al.*, (2011). L'épaisseur moyenne de la nacre est de 2,07 mm, enregistré à Maharès. En se basant sur ce critère, le site de Maharès s'avère comme un site pilote puisqu'il fournit des Huîtres ayant une couche nacrée relativement épaisse.

La croissance, la survie, l'épaisseur de la couche de nacre et sa qualité étaient sensiblement différentes d'un site à l'autre. Les observations ont montré que, de façon générale, la croissance de l'huître décroît à mesure que la latitude augmente. (Guenther J *et al.*, 2006 et Southgate P, 2007).

III. Etude morphologique de la coquille

Des mesures métriques de la Hauteur, du renflement et de la ligne charnière ont été indispensables dans le calcul des coefficients morphologiques (fig. 43).



Figure 43. Mesure des paramètres linéaires chez *Pinctada radiata* A : Mesure de la Hauteur (H); B : Mesure du renflement (R) ; C : Mesure de la ligne charnière (Lch)

Avec :

- La hauteur (H) : correspond à la distance dorso-ventrale maximale séparant le bord dorsal du bord ventral de l'axe de la coquille.
- le renflement (R) : est la distance comprise entre les deux plans tangents à la surface externe des deux valves, et parallèle au plan de jonction.
- Ligne charnière (Lch) : correspond à la distance comprise entre les extrémités de l'oreille antérieure et de l'oreille postérieure.
- L : La largeur: qui correspond à la dimension antéro-postérieure
- Hvd : la hauteur de la partie nacrée de la valve droite : elle représente la distance maximale entre la charnière et la limite supérieure de la partie nacrée.

- Lvd : la largeur de la partie nacrée de la valve droite : elle représente la distance maximale entre la limite antérieure et postérieure de la partie nacrée.
- Hvg : la hauteur de la partie nacrée de la valve gauche
- Lvg : la largeur de la partie nacrée de la valve gauche
- Pt : le poids total frais
- Pcoq : le poids de la coquille constituée par les deux valves et débarrassées de la chair
- Pvd : le poids de la valve droite
- Pvg : le poids de la valve gauche

Nous avons étudié les différentes relations allométriques globales liant les paramètres métriques (Fig.44) et pondéraux suivants :

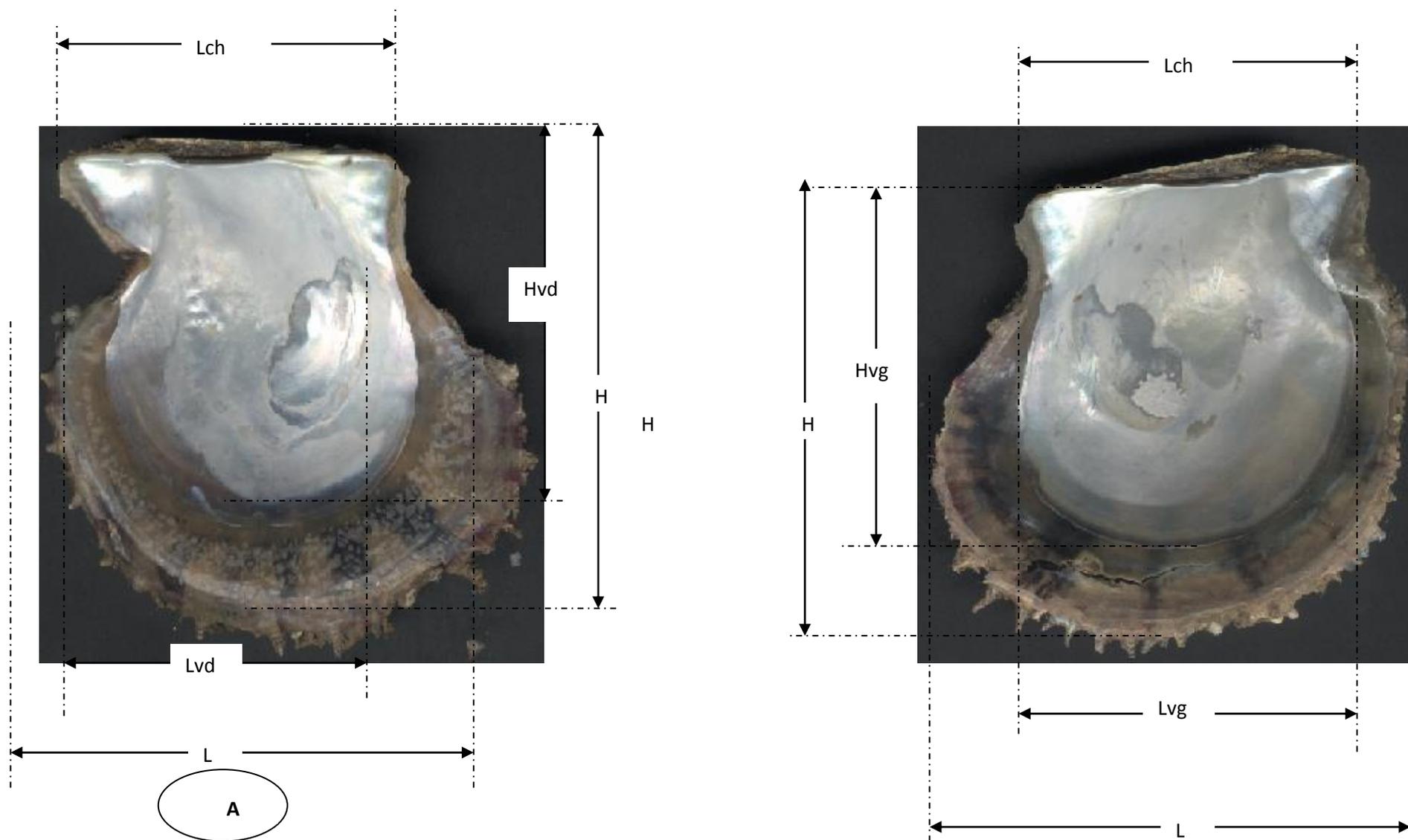


Figure 44. Mesures des paramètres linéaires de la valve droite (A) et la valve gauche (B) de *Pinctada radiata*

III.1. Etude biométrique

1. Mensurations

De retour au laboratoire, les échantillons ont été soigneusement lavés et débarrassés de leurs épibiontes. Ces derniers sont conservés dans l'alcool à 70% pour une étude ultérieure. L'égouttement des pintadines sur un papier filtre est réalisé avant de commencer toute mensuration (Fig.45).



Figure 45. Egouttement des échantillons sur un papier filtre

Les mesures métriques ont été effectuées au moyen d'un pied à coulisse électronique précis au 1/100 de mm près (Fig.45).

Les mesures pondérales ont été effectuées en utilisant une balance de précision à 0,01g près.

III.2. Mesure de l'épaisseur de la couche de nacre

Des coupes histologiques de la coquille de *P. radiata* ont été indispensables pour mesurer l'épaisseur de la couche de nacre. L'axe de la coupe a été choisi en se référant aux travaux de Anwar *et al.*, (1990), mais également, en tenant compte de l'axe de référence défini par Hynd (1955). L'axe de Hynd est tracé à partir du bord dorsal en passant par le bord antérieur de la marque du muscle adducteur jusqu'au bord distal, en suivant la courbure du motif rayé de la surface externe. L'axe de la coupe que nous avons adopté suit la croissance de la Pintadine : il est perpendiculaire à la charnière et tracé à partir d'un point fixe. Cet axe est en fait distant de 1/3 la longueur de la charnière de l'oreille antérieure (Fig. 46).

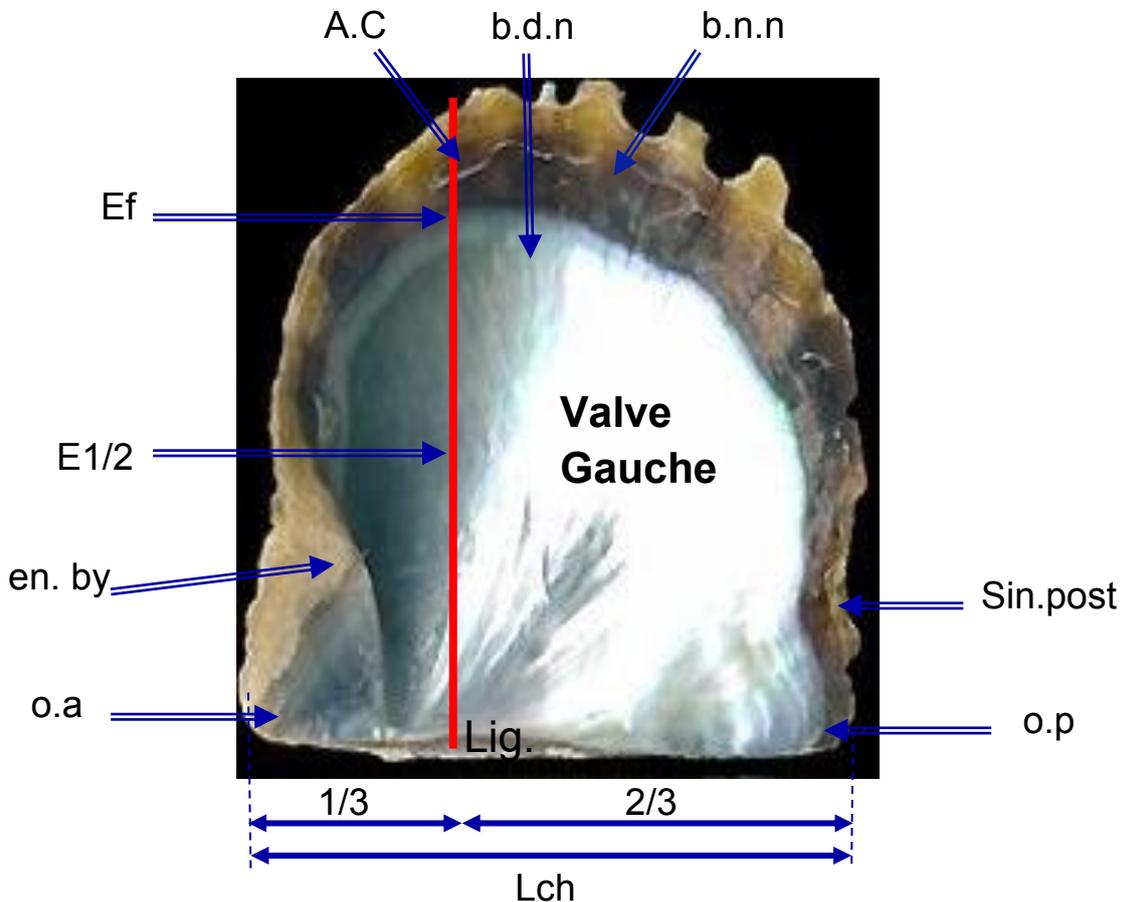


Figure. 46 Traçage de l'axe de la coupe sur la valve gauche d'un spécimen de *P.radiata*

A.c : axe de la coupe ; **b.n.n** : bord non nacrier ; **b.d.n** : bord distal de la nacre ; **sin.post** : sinus postérieur ; **o.p** : oreille postérieure ; **Lig.** : Ligament ; **Lch** : ligne charnière ; **o.a** : oreille antérieure ; **en.by(Eb)** : encoche byssale ; **E_{1/2}** : épaisseur mesurée à une distance de 1/2 Hvg ; **Ef** : épaisseur mesurée à l'extrémité du bord nacré.

Ces coupes ont été réalisées en utilisant un micro-moteur (Sirio SR 250 T) muni d'une scie diamantée, après fixation des valves (Fig. 47).

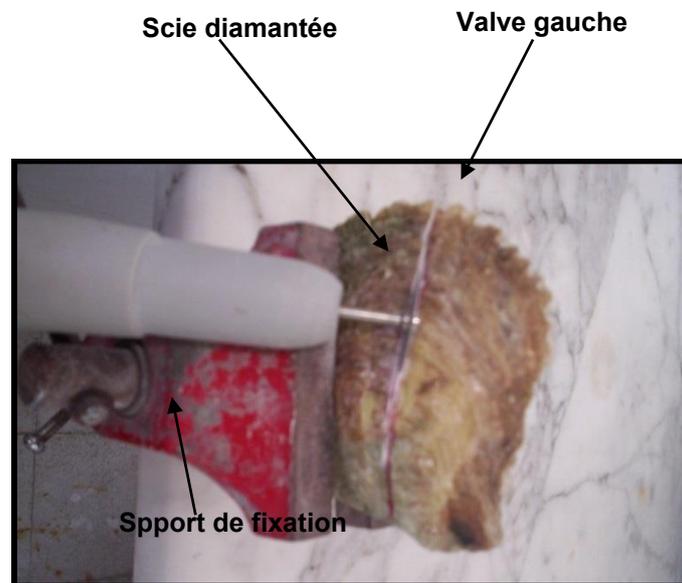


Figure 47. Opération de coupe

La mesure de l'épaisseur de la couche de nacre a été déterminée à l'aide d'une loupe binoculaire, munie d'un micromètre, en lumière incidente. Sur chaque valve, quatre mesures ont été effectuées (E_c , E_b , $E_{1/2}$, E_f) (Fig. 44 et 46). Ensuite nous avons calculé, pour chaque valve, l'épaisseur moyenne (E_m).

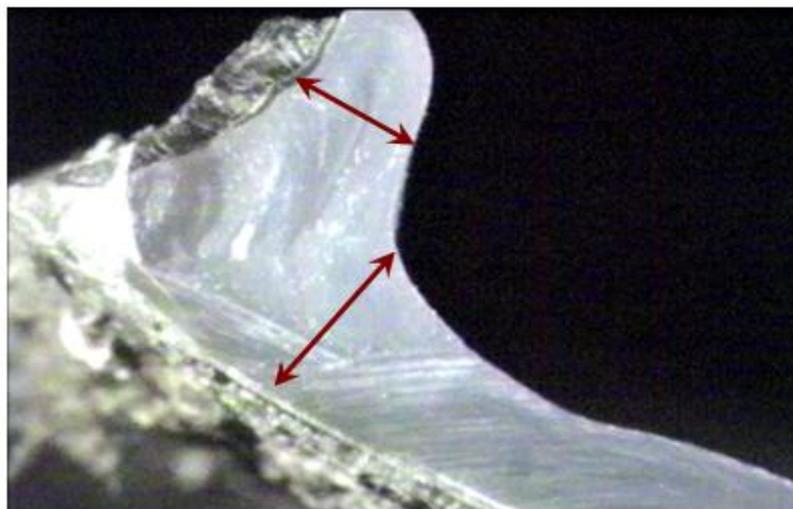


Figure 48. Mesure de l'épaisseur de la couche nacrée sous loupe binoculaire (G*63)

VI. Préparation de la poudre de nacre

L'extraction de la poudre de nacre à partir de l'huître perlière *P.radiata* a été possible suite à une série d'étapes comprenant:

Première étape : Elimination de la masse viscérale.

Deuxième étape : Lavage des coquilles à l'eau courante.

Troisième étape : Lavage dans un bain ultrasons afin de débarrasser les coquilles du periostracum ainsi que de toutes matières organiques (reste de chair, Algues, Ascidies...).

Quatrième étape : Séchage des coquilles à l'air libre.

Cinquième étape : raclage de la couche calcitique externe

Cette dernière couche est obtenue sous forme de morceaux après raclage de deux couches les plus superficielles à l'aide d'un micro-moteur électrique muni d'une fraise dentaire (fig. 49).



Figure. 49 Morceaux de nacre obtenus après raclage

Sixième étape : broyage de la nacre.

Les morceaux de nacre obtenus sont tout d'abord broyés à l'aide d'un mortier, puis dans un broyeur Retsch RM100 (Fig. 50, 51) afin d'obtenir la poudre de nacre.



Figure. 50 Opérations de broyage à l'aide d'un mortier



Figure. 51 Opérations de broyage à l'aide broyeur Retsch RM100

IV.1. Tamisage et conditionnement de la poudre de nacre

Le tamisage de la poudre de nacre a été réalisé moyennant un tamiseur de type Retsh (AS 200 basic) sous une amplitude de 70 à 90 V pendant 40 minutes. Les tamis de mailles égales à 50, 63, 71, 100, 125 et 150 micromètres ont été utilisés. La poudre de nacre ayant la granulométrie requise est ensuite conditionnée dans des sachets scellés en polyéthylène de faible densité. Cette poudre serait utilisée dans le reste des analyses.

IV.2. Estimation du rendement en poudre de nacre

Afin d'évaluer le rendement en poudre de nacre de l'huître perlière *P.radiata*, nous avons choisi d'une manière aléatoire un seul échantillon puisque l'opération d'extraction mécanique est très lourde. L'échantillon choisi a été tout d'abord pesé. Ensuite, les coquilles ont été débarrassées de leurs chairs, lavées par l'eau et les ultrasons puis séchées à l'air libre.

Après élimination des couches externes, la nacre a été broyée. Enfin, la poudre de nacre a été récupérée et pesée.

Le rendement en masse de poudre de nacre (R_{mp}) a été calculé par la formule suivante :

$$R_{mp} = \frac{P_t}{P_n} \times 100$$

Avec :

- P_t : poids total de l'échantillon frais (coquilles + masse viscérale)
- P_n : poids de la poudre de nacre

IV.3. Traitement statistique des données

Les descripteurs statistiques utilisés sont ceux décrits par Schwartz (1963), à savoir : la moyenne « μ », l'écart type « σ » et la variance « σ^2 ».

IV.3.1. La moyenne

Est définie comme suit :

$$\mu = \frac{\sum (x_i)}{N}$$

Avec :

- x_i : valeur du paramètre mesuré.
- N : Taille de l'échantillon

IV.3.2. La variance

C'est la somme des carrés des écarts par rapport à la moyenne / nombre de degrés de liberté (ceci lorsque le nombre d'individus composant l'échantillon est réduit ; sinon, utiliser $N' = N$).

La formule s'écrit de la manière suivante :

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}$$

IV.3 .3 L'écart type

Il est défini par la racine carrée de la variance. L'écart type mesure la dispersion de l'échantillon autour de la moyenne :

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$$

V. Analyses effectuées

Le stockage des réserves chez les bivalves peut être fait dans différents tissus dont la nature varie suivant les différents groupes de bivalves. Ainsi, l'organe prélevé pour l'étude de la composition biochimique diffère non seulement du bivalve mais aussi de la réserve énergétique que l'on désire étudier.

Chez les Pectinidés et les Vénéridés, le site de stockage est le muscle adducteur (Ansell, 1974 ; Comely, 1974 ; Taylor et Venn ; 1979 ; Barber et Blake, 1981 ; Whyte *et al.*, 1990). Par ailleurs, Seed (1971) se base sur cet organe pour l'étude des protéines chez les espèces de Mytilidés. Pour l'espèce *Pinctada mazatlanica*, le muscle adducteur s'est révélé être le plus important site de stockage de l'énergie (Saucedo *et al.*, 2002).

Cependant, d'autres auteurs comme Beninger et Lucas (1984) ayant travaillé sur deux espèces de Vénéridés et Dare et Edwards (1975) et Dalla Via *et al.* (1987) pour les populations de la moule ont utilisé l'animal entier pour leurs analyses. Ainsi dans cette partie, nous avons utilisé l'animal entier pour déterminer la concentration en lipides totaux, les lipides polaires et les catégories lipidiques ainsi que les protéines totales afin de trouver une relation entre les variations saisonnières de ces composés de *P. radiata*.

V.1 Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux a été effectuée selon de la méthode de Folch *et al.* (1957) modifié par Bligh et Dyer (1959). Cette technique consiste à fixer l'échantillon dans de l'eau bouillante (salée à 15 ‰) qui doit couvrir toute la chair afin de dénaturer les phospholipases (Shewfelt, 1981).

La chair est ensuite broyée (n=6) dans un mélange de solvant chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v) contenant 0,01% de BHT (hydroxytoluène butylé) comme antioxydant. Après centrifugation, la phase inférieure est récupérée dans un flacon pesé au préalable. L'extrait est par la suite évaporé à sec sous un courant continu d'azote et le flacon est repesé une deuxième fois.

Comme étape finale, les échantillons sont concentrés à 10mg/ml par l'ajout d'une quantité adéquate du mélange d'extraction en fonction de la quantité de lipides présente dans chaque échantillon. Cette méthode de double pesée nous permet de déterminer la quantité de lipides totaux existant dans un échantillon.

V.2. Séparation des catégories lipidiques

Les catégories lipidiques ont été séparées par chromatographie à double développement sur couche mince de microparticules de gel de silice (Olsen & Henderson, 1989) (Fig. 52). Des doses de 400 µl d'extraits lipidiques sont déposées sur des plaques de gel de silice plates (Silica gel 20 * 20, layer; 0.25 mm silica gel, Merck and Co. Ltd., Darmstadt, Germany).

Les différentes catégories lipidiques sont séparées par deux types de solvants. Pour les lipides polaires (Phosphatidyléthanolamines [PE], Phosphatidylinositols [PI], Phosphatidylcholines [PC] et Phosphatidylsérines [PS]), le solvant utilisé est un mélange d'hexane, éther diéthylique et acide acétique glacial dans les proportions suivantes (80: 20: 2, v /v/v).

Pour les lipides polaires (ç. à. d. séparation des lipides polaires des lipides neutres)(Cholestérol estérifié [Chol], Triacylglycérol [TAG], Acides Gras Libres [AGL] et Mono-diacylglycérol [MDG]), le solvant de séparation est composé de méthylacétate, isopropanol, chloroforme, méthanol et 0,25 % de KCl (25: 25: 25: 10: 9, v/v). Les différentes catégories lipidiques sont visualisées sous lumière ultraviolette en utilisant un lecteur de plaque (UV transilluminator MUV21) après pulvérisation sur la plaque du 2'-7' dichloro-fluorescéine dans le méthanol absolu. On aura ainsi les lipides neutres qui migrent en haut de la plaque sans séparation de ses catégories.

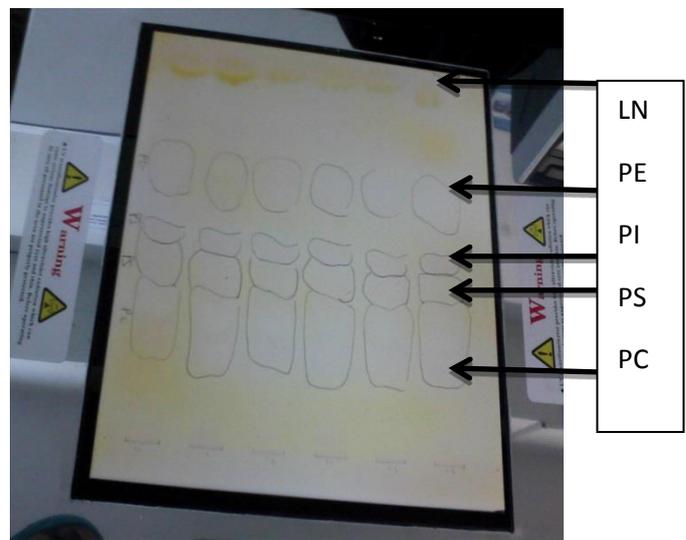
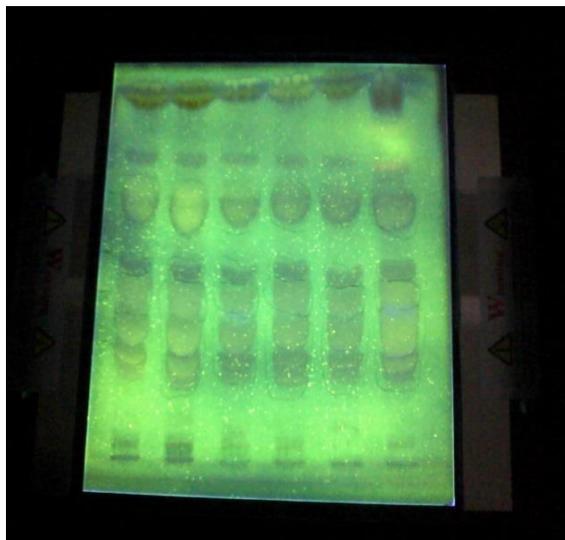
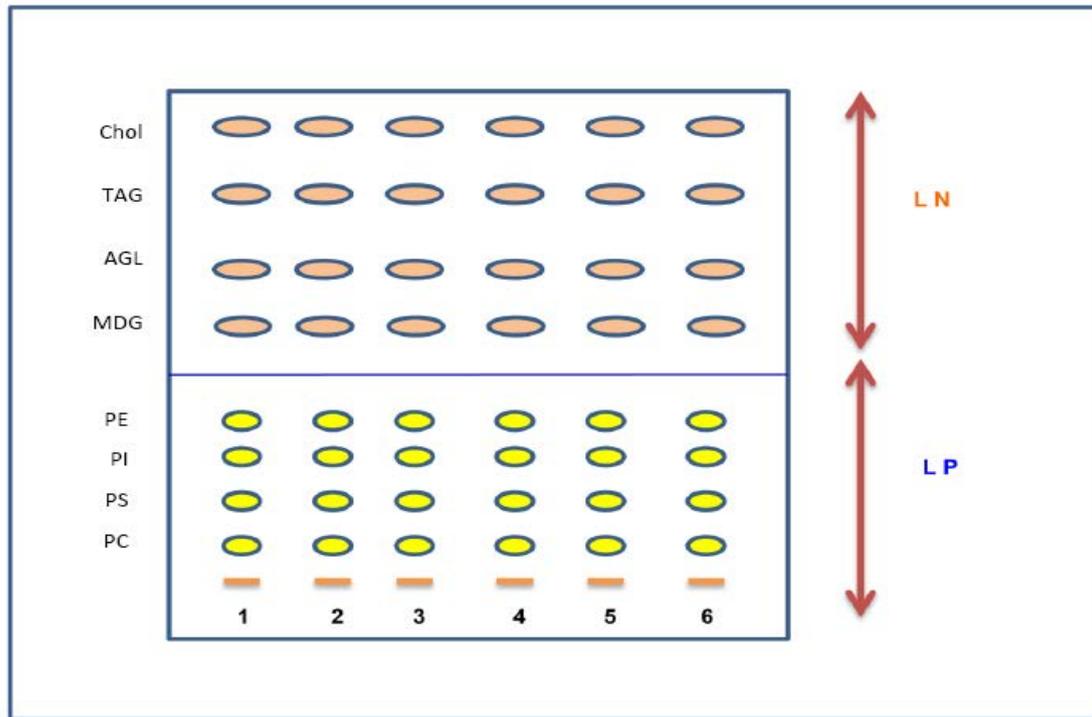


Figure 52. Schéma montrant la séparation de différentes catégories lipidiques sur plaque de gel de silice. LP : Lipides polaires ; LN : Lipides neutres ; PC : Phosphatidylcholines ; PS : Phosphatidylsérine ; PI : Phosphatidylinositol ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; MDG : Mono-diacylglycérol ; AGL : Acides Gras Libres ; TAG : Triacylglycérol ; Chol : Cholestérol estérifié.

L'identification des différents taches a été réalisée dans le cadre de la collaboration avec l'équipe du professeur Navarro (Institut d'aquaculture Torre de la Sal en Espagne) qui dispose des standards adéquats de chaque catégorie lipidique (PC, PE, PI, PS).

Les différentes taches des catégories lipidiques ont été récupérées dans l'hexane et débarassées de la silice par centrifugation en vue de leur dosage par chromatographie en phase gazeuse.

V.3. Analyse des acides gras

V.3.a.Obtention des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques des acides gras ont été obtenus par une trans-estérification selon la méthode de Cecchi *et al.* (1985). Les extraits des lipides totaux sont récupérés dans 2 ml d'hexane. La méthylation des acides gras est effectuée par l'addition de 0,5 ml d'une solution de méthylate de sodium à 3% dans le méthanol pendant 10 minutes. Après agitation et décantation, sont ajoutés 0,2 ml de H₂SO₄, 5 ml de NaCl (15%) et 0,5 ml du méthyle nonadecanoate C19:0 (Sigma), acide gras absent dans les échantillons et dans les Bivalves de façon générale. Pour cela, le C19:0 est pris comme standard interne. Après passage au vortex, la phase supérieure est récupérée puis évaporée sous l'azote. Les esters méthyliques sont par la suite récupérés dans 50µl d'hexane et conservés à -30°C pour être séparés par la suite par chromatographie en phase gazeuse.

V.3.b. Séparation des esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse

La séparation des esters méthyliques des acides gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse par un appareil Agilent, modèle HP 6890 équipé d'un injecteur split/splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme à 275°C et d'une colonne capillaire (HP Innowax) de 30 m de longueur dont le diamètre interne est de 250 µm et l'épaisseur du film est de 0,25 µm. Lors des injections, la température de l'injecteur a été maintenue à 250°C. Le four a été programmé pour passer de 50°C à 180°C à raison de 40°C par minute puis de 180°C à 220°C à 1,33°C par minute avant de se stabiliser à 220°C pendant 7 minutes. Le gaz vecteur utilisé étant l'azote.

La colonne capillaire à phase stationnaire polaire permet la séparation des esters méthyliques d'acides gras en fonction de la longueur de leurs chaînes carbonées et du degré d'insaturation.

Chaque acide gras est représenté par un pic sur le chromatogramme. Les différents pics des acides gras sont intégrés et analysés par le programme «HP chemstation software».

L'identification des acides gras est basée sur une comparaison de leurs temps de rétention par rapport à ceux du standard (SUPELCO PUFA-3) injecté dans les mêmes conditions chromatographiques (Fig.53).

Les C22 :2i et les C22 :2j n'ont pas de standard sur le commerce leur mise en évidence a été faite en collaboration avec un laboratoire spécialisé dans les acides gras des organismes marins Torrè Del Salte à Valence en Espagne sous la direction de monsieur le professeur Juan Carlos Navarro Tarrega.

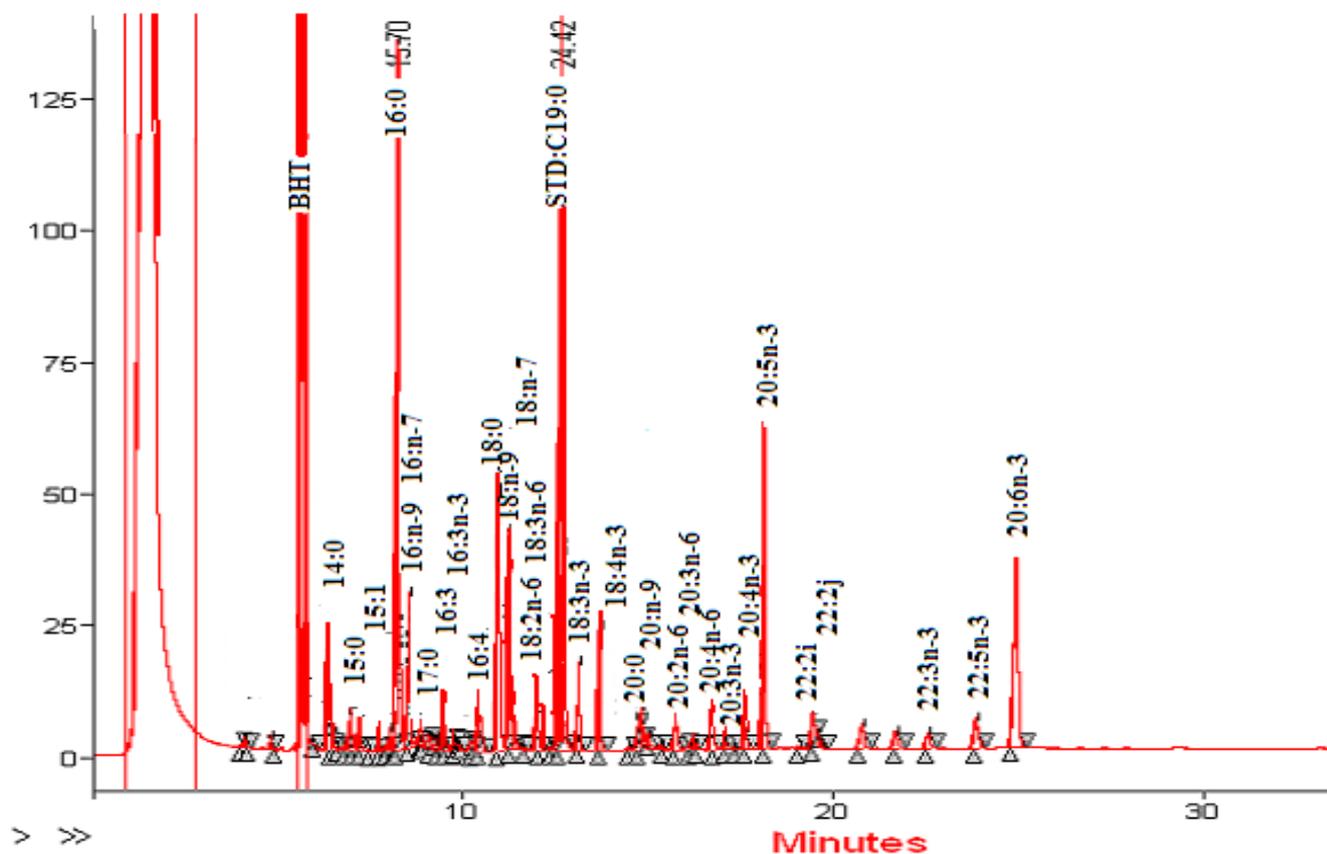


Figure 53. Chromatogramme montrant les différents pics qui correspondent aux acides gras présents dans l'extrait lipidique analysé.

Les surfaces des pics sont proportionnelles aux quantités des acides gras correspondants. Ainsi, les pourcentages des acides gras sont calculés à partir des surfaces des pics selon la relation suivante :

$$\% \text{ Acide gras} = (S/\sum S) \times 100$$

Avec :

S : surface du pic correspondant à l'acide gras considéré.

$\sum S$: Somme des surfaces de tous les pics du chromatogramme.

V.4. Dosage des protéines totales

Les teneurs en protéines ont été estimées par la technique colorimétrique de Lowry *et al.* (1951) qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

L'intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution.

L'absorbance est mesurée à 540 nm par un spectrophotomètre de marque Jenway 6300. La gamme étalon a été réalisée avec de l'albumine sérique bovine « BSA » comme standard.

V.5. Teneur en eau

Les teneurs en eau dans la chair des différents échantillons étudiés ont été déterminées par la différence de poids avant et après séchage à l'étuve à 105°C pendant 24 h. La teneur en eau est calculée suivant la formule suivante :

$$(PF - PS) / PS \times 100 \quad \text{avec PF : Poids frais et PS : Poids sec.}$$

V.6. Extraction des molécules de nacre (ESM)

L'extrait de nacre est obtenu par une méthode utilisant de l'éthanol avec étape de centrifugation, puis évaporation en utilisant un Rotavapor et lyophilisation. On nomme cet extrait : l'ESM (Ethanol Soluble Matrix). Il contient essentiellement des lipides, mais aussi des petites molécules (Fig. 54).

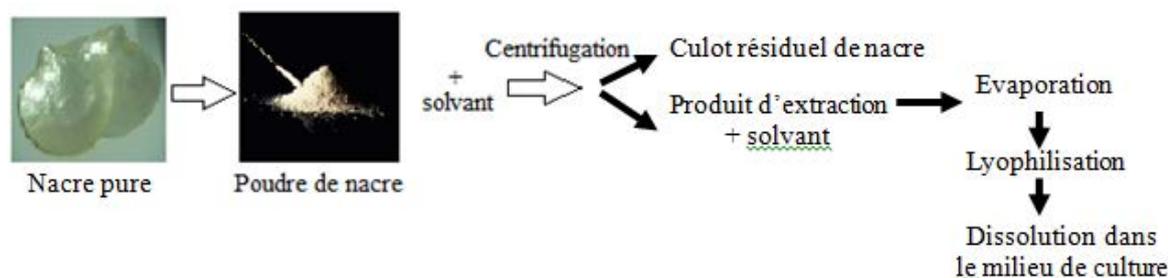


Figure 54. Schéma d'extraction des molécules d'ESM

Il faut peser 250g de poudre de nacre et ajouter 500 mL d'éthanol absolu. Mettre à agiter dans un ballon préalablement rincé à l'alcool, pendant 24h à 40° C puis répartir le mélange dans tubes à centrifugation fermés (50mL). Centrifuger à 3000 rpm pendant 20min et filtrer le surnageant sur double papier filtre. Ensuite évaporer doucement l'éthanol à l'évaporateur rotatif (P= 200mbar, rotation 100, t° bain=40°C). Le produit est ensuite dilué dans de l'eau ultrapure (le ballon est rincé deux fois avec de l'eau et une fois à l'éthanol). Rassembler le tout dans un ballon ou récipient pour lyophiliser. Le congeler à -80°C, si possible et le lyophiliser. Congeler le culot restant et le lyophiliser aussi. Après lyophilisation complète, peser les deux produits pour le calcul du rendement. (Poudre de nacre = surnageant ESM + culot ESM co-produit).

Pour servir aux traitements des cellules et après avoir dissoudre la quantité souhaité d'ESM une concentration de 20 mg/mL dans le milieu de culture la filtrer sur 0,2 µm de manière stérile et aliquotée puis conservée à -20°C.

Cette méthode est utilisée pour obtenir l'ESM de la nacre de l'huître perlière *P. radiata* (Br) et celui de *P. margaritifera* (Bm) pour une comparaison.

V.7. Extraction des lipides totaux de la nacre et de la chair

L'extraction des lipides totaux a été effectuée selon de la méthode de Folch *et al.* (1957) modifié par Bligh et Dyer (1959). (Décrite dans V.1).Après avoir pesé la quantité d'extrait souhaité cette quantité en tant que solutions concentrées est ensuite resuspendu dans du DMSO à une concentration de 100 mg/mL. La solution est filtrée de façon stérile (0,22 µm) et aliquotée puis conservée à -20°C. Cette méthode est utilisée pour obtenir l'extrait des lipides totaux de la nacre(LN) et de la chair (LC) de l'huître perlière *P. radiata* afin de tester leurs pouvoirs ostéogénique.

VI. La culture cellulaire

VI.1. Milieux de culture utilisés pour les deux types de cellules

Tableau IV. Composition du milieu de culture des cellules ATDC5

Milieu de culture des cellules ATDC5 (milieu DMEM/F12 ITS)	
Composition des milieux	<i>Milieu DMEM/F12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium 1X)</i> (Gibco) + 5% SVF (Dominique Dutscher) + 1% L-Glutamine 200 mM 100X (Gibco) (2 mM final) + 20 µg/mL Transférine (Sigma) + 3.10 ⁻⁸ M Sélénite de sodium (Sigma) + Insuline (10mg/ml)
Antibiotiques	1% PenStrep (10000 U/mL Pénicilline, 10000 µg/mL Streptomycine) (Gibco)

Tableau V. Composition du milieu de culture des cellules MC3T3

Milieu de culture des cellules MC3T3 (milieu αMEM) T⁺	
Composition des milieux	<i>Milieu MEM Alpha (Minimum Essential Medium 1X)</i> (Gibco) + 10% SVF (Dominique Dutscher)
Antibiotiques	1% PenStrep (10000 U/mL Pénicilline, 10000 µg/mL Streptomycine) (Gibco)

VI.2. Entretien des cellules

Les cellules ATDC5 sont stockées à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cryotubes à 10^6 cellules/mL, elles sont décongelées, remises dans du milieu DMEM-F12 TS (sans insuline) (tab IV), centrifugées et resuspendues dans du milieu, puis repiquées et incubées à 37°C , 5% CO_2 . Le milieu est changé tous les 3 à 4 jours avec du milieu complet DMEM-F12 TS. Une fois les cellules à confluence, un passage est réalisé, les cellules sont lavées avec du PBS 1X (GIBCO®), puis de la trypsine (GIBCO®), qui est une endoprotéase, est utilisée pour hydrolyser les liaisons peptidiques entre les cellules et entre la flasque et les cellules, elle transforme les chaînes polypeptidiques en chaîne protéique plus courte. L'action de la trypsine sera inhibée par l'ajout de milieu TS contenant du sérum de veau fœtal (DUTSCHER®), présentant une grande quantité de protéines, qui va inhiber son activité trypsique par un excès de substrat. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1300 rpm / min pendant 5 minutes, pour enlever le surnageant et le culot est remis en suspension avec un volume permettant de répartir 1.10^6 cellules/flasque T75 de 10 mL de milieu complet TS. Les cellules pourront adhérer à la paroi et se développer.

Les démarches d'entretien des cellules MC3T3 sont les mêmes que pour les cellules ATDC5CH sauf que le milieu utilisé est le milieu α MEM (tableau V).

VI.2.1. Ensemencement en micromasse des plaques 12 puits des cellules

ATDC5

Pour étudier les effets des différents extraits de la poudre de nacre, les cellules ATDC5 sont ensemencées en micromasses dans des plaques 12 puits. Les ensemencements sont réalisés la veille du premier jour de traitement.

Le but est de déposer une micromasse de cellules soit plus exactement $10\mu\text{L}$ d'une suspension de cellules ATDC5 à une concentration de 20.10^6 cellules ATDC5/mL. On sait d'après notre expérience qu'une flasque T175 à confluence contient environ 1.10^6 ϕ ATDC5. Il faut donc anticiper le nombre de flasques T175 à lancer en culture pour être sûr d'avoir suffisamment de cellules pour pouvoir faire les micromasses sachant que dans chaque puits (des plaques à 12 puits) il y a une micromasse qui est déposée au centre de chaque puits soit 200000 cellules par micromasse. La méthode de trypsination est identique à celles déjà décrite antérieurement et le comptage se fait à partir de la concentration cellulaire déterminée en cellule de Malassez qu'il faut calculer le volume de suspension cellulaire à prélever et à

déposer dans les puits pour obtenir le nombre de cellules désiré. La suspension cellulaire est reprise dans le volume adéquat de milieu TS 5% pour obtenir une concentration de $20.106 \text{ } \phi$ ATDC5/mL. Une fois la goutte déposée, mettre les plaques 3 à 4H à l'incubateur 37°C , 5% de CO_2 sans les bouger et sans ajout de milieu afin de faire sécher les amas cellulaires. L'absence de milieu va permettre aux cellules de créer une matrice extracellulaire et donc de garder la forme d'une micromasse. Si on avait ajouté directement du milieu de culture, les cellules se seraient étalées. Ensuite $500\mu\text{L}$ de TS 5% sont délicatement déposés dans chaque puits et les plaques sont laissées 24H à l'incubateur à 37°C . Le milieu est retiré délicatement sans toucher les micromasses, 1 mL de milieu TS 5% frais est déposé et les plaques sont placées 24H à 37°C . Il s'agit donc du jour Jour J-1 (: Ensemencement des puits des plaques 12 puits avec 200 000 cell/micromasse/puits).

La culture cellulaire se fera avec une cinétique de 14 jours et l'expérience est reproduite 3 fois ($n=3$).

✚ Le traitement se fera en deux parties avec :

- 3 plaques destinées à l'histologie : J7, J10, J14 pour les colorations RA (rouge Alizarine), BA (bleu Alcian), RS (rouge Sirius).
- Et 4 plaques destinées à la biologie moléculaire : J1, J7, J10, J14 pour les QPCR

Les cellules en micromasse sont traitées tous les 2 jours, le milieu est aspiré pour ne laisser que $0,5\text{mL}$ /puits et 1 mL de milieu est ajouté dans chaque puits en semaine. Pour le week-end il faut ajouter 3 mL de milieu.

VI.2.2. Conditions de culture

De même qu'avec les deux types de cellules, toutes les manipulations sont effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé ou à usage unique.

VI.2.3. Traitement des cellules ATDC5

Le traitement se fera avec les extraits lipidiques de la nacre et de la chair de *P. radiata* et les extraits ESM de la nacre de *P. radiata* et *P. margaritifera* (Fig.55)

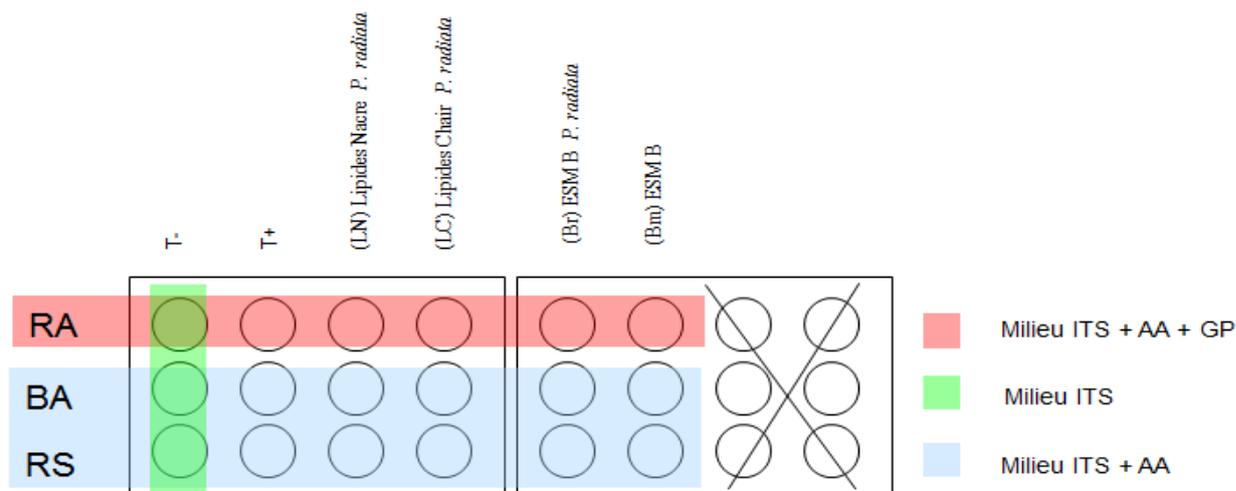


Figure.55 Modèle de plaque montrant les différents traitements sur les ATDC5.

Le milieu DMEM-F12 complet + insuline (ITS) est utilisé comme témoin négatif et le milieu ITS avec ajout d'acide ascorbique (AA) à 50 µg/mL et de β-glycérophosphate (β-GP) à 10 mM sert de témoin positif car l'AA et le β-GP sont des inducteurs de l'hypertrophie et de la minéralisation de la lignée ATDC5. Les milieux ITS plus de l'AA et du β-GP avec 100ug/ml Lc, 100ug/ml Ln, de l'ESM 100ug/ml Br et de l'ESM 100ug/ml Bm et les milieux ITS plus de l'AA avec les mêmes traitements voir le tableau récapitulatif VI.

Tableau VI. différents traitements sur cellules ATDC5

Milieu	COMPOSITION	Traitement	Pour Coloration	Pour PCR Q
milieu ITS	Milieu de culture des cellules ATDC5 (milieu TS)+ 10ug/ml d' insuline			
ITS +AA+GP	Milieu ITS+ 50ug/ml d' acide ascorbique+10m M de <u>Beta</u> glycérophosphate	<u>Lc</u> : 100ug/ml <u>Lc</u>	Condition pour le rouge alizarine	Condition pour la PCR
		Ln : 100ug/ml Ln		
		ESM r : 100ug/ml <u>Br</u>		
		ESM m : 100ug/ml <u>Bm</u>		
ITS+AA	Milieu ITS+ 50ug/ml d' acide ascorbique	Lc : 100ug/ml Lc	Condition pour le bleu alcian et le rouge sirius	
		Ln : 100ug/ml Ln		
		ESM r : 100ug/ml <u>Br</u>		
		ESM m : 100ug/ml <u>Bm</u>		

VI.2.4. Arrêt des traitements

L'arrêt du traitement des jours J1, J7, J10 et J14 des plaques destinés pour les différentes colorations et des plaques destinés au q pcr se fait comme suit :

Jour J1 :

Arrêt plaque pour QPCR

- Jour J7 :

Coloration rouge alizarine, Coloration bleu alcian, Coloration rouge sirius

Arrêt plaque pour QPCR

- Jour J10 :

Coloration rouge alizarine, Coloration bleu alcian, Coloration rouge sirius

Arrêt plaque pour QPCR

- Jour J14 :

Coloration rouge alizarine, Coloration bleu alcian, Coloration rouge sirius

Arrêt plaque pour QPCR

Pour la plaque destinée à l'extraction d'ARN, le milieu est retiré en totalité des puits, un rinçage au PBS est effectué, les puits sont ensuite complètement asséchés et la plaque est stockée dans un congélateur à -80°C.

Pour les plaques destinées aux colorations Rouge Alizarine, Rouge Sirius et Bleu Alcian le milieu est retiré en totalité des puits. Effectuer un rinçage au PBS et déposer 1 mL d'éthanol 70% dans les plaques 12 puits. Laisser fixer 30 min à température ambiante. Une fois la fixation terminée commencer les colorations ou parafilmé les plaques en laissant l'éthanol dans les puits et les stocker à -20°C.

VI.2.5. Ensemencement en monocouche des plaques de 24 puits des cellules MC3T3

Après avoir aspiré le milieu des flasques T75 contenant les cellules MC3T3, ces dernières sont lavées avec du PBS 1X (GIBCO®), puis de la trypsine (GIBCO®) afin de décoller les cellules. L'action de la trypsine sera inhibée par l'ajout de milieu (α -MEM, GIBCO®) contenant du sérum de veau foetal (DUTSCHER®), en prenant un peu de la suspension dans du bleu trypan (50/50 μ l) afin de nous monter les cellules mortes des vivantes au microscope nous procédons au comptage des cellules par la formule suivante :

Densité de cellules /ml = nombre de cellules* dilution*4 *1000

Les cellules sont ensuite centrifugées à 1300 rpm / min pendant 5 minutes, pour enlever le surnageant et le culot est remis en suspension avec un volume permettant d'avoir $8,4 \cdot 10^6$ cell pour la manipulation à raison de 50 000 ϕ MC3T3/puits. Après avoir déposé 800 μ l de la suspension/puits nous ajoutons 1ml du milieu α -MEM et les plaques sont ensuite laissées 24H à l'incubateur à 37°C, 5% de CO₂. Il s'agit donc du jour Jour J-1(: Ensemencement des puits des plaques 24 puits avec 50 000 cell /monocouche /puits).

La culture cellulaire se fera avec une cinétique de 14 jours avec une quantité de manipulation (n=3).

✚ Le traitement se fera en deux parties avec :

- 3 plaques destinées à l'histologie : J7, J10, J14 pour la colorations RA (rouge alizarine).
- Et 4 plaques destinées à la biologie moléculaire : J1, J7, J10, J14 pour les QPCR
-

Les cellules en monocouche sont traitées tous les 2 jours, Les milieux ont été renouvelés tous les 2-3 jours et quand les cellules arrivent à confluence ainsi le milieu de traitement est aspiré, 0,5mL/puits et de milieu de traitement est ajouté dans chaque puits en semaine. Pour le week-end il faut ajouter 1 mL de milieu.

VI.2.6. Traitement des cellules MC3T3

Le traitement se fera avec les six conditions comme suit :

T⁻ (Témoin négatif): milieu de culture aMEM

T⁺ (Témoin positif): milieu de culture aMEM + AA (acide ascorbique 50ug/ml)

+GP (10mM de β -glycérophosphate)

Ln (lipides Nacre *P.radiata*): milieu de culture aMEM + AA + GP + extrait lipidique de nacre (100 μ g/ml)

Lc (lipides Chair *P.radiata*): milieu de culture aMEM + AA + GP + extrait lipidique de chair (100 μ g/ml)

Br (ESM *P.radiata*):milieu de culture aMEM + AA + GP + ESM de *P.radiata* (100 μ g/ml)

Bm (ESM *P.margaritifera*):milieu de culture α MEM + AA + GP +:ESM de *P.margaritifera* (100 μ g/ml), (fig .56).

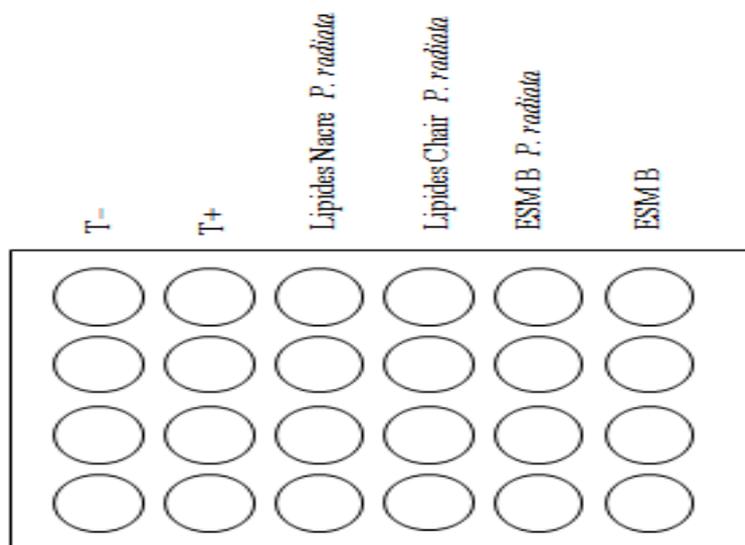


Figure .56 Modèle de plaque montrant les différents traitements sur les MC3T3

Les pré-ostéoblastes MC3T3, seront un modèle utilisé pour caractériser le pouvoir ostéogénique des extraits (LC, LN, ESMm ou Bm et ESMr ou Br) et ainsi prouver la stimulation des phases terminales de la différenciation ostéoblastique. Les cellules ont été cultivées dans un milieu Minimum Essential Medium alpha medium (α -MEM, GIBCO®) enrichi de 10% SVF (ATCC) avec 1% pénicilline/streptomycine (Penicillin-Streptomycin-, ATCC). Les cellules sontensemencées à J0 dans des microplaques de 24 puits (Corning, stérile). Les conditions de cette étude ont nécessité l'ajout d'inducteurs de minéralisation : d'une part du β -glycérophosphate (10mM) (Sigma-Aldrich) et d'autre part de l'acide ascorbique (50 μ g.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich). Afin de comparer l'effet des inducteurs, la colonne des puits du milieu T⁻ sans inducteur de minéralisation.

VI.2.7. Arrêt des traitements

L'arrêt du traitement des jours J1, J7, J10 et J14 des plaques destinés pour les différentes colorations et des plaques destinées au QPCR se fait comme suit :

Jour J1 :

Arrêt plaque pour QPCR

- Jour J7 :

Coloration rouge alizarine et arrêt plaque pour QPCR

- Jour J10 :

Coloration rouge alizarine et arrêt plaque pour QPCR

- Jour J14 :

Coloration rouge alizarine et arrêt plaque pour QPCR

Pour la plaque destinée à l'extraction d'ARN, le milieu est retiré en totalité des puits, un rinçage au PBS est effectué, les puits sont ensuite complètement asséchés et la plaque est stockée dans un congélateur à -80°C.

Pour les plaques destinées aux colorations Rouge Alizarine, le milieu est retiré en totalité des puits. Effectuer un rinçage au PBS et déposer 800 µL d'éthanol 70% dans les plaques 12 puits. Laisser fixer 30 min à température ambiante. Une fois la fixation terminée commencer les colorations ou parafilmé les plaques en laissant l'éthanol dans les puits et les stocker à -20°C.

VI.2.8. Etude de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire.

Un test de cytotoxicité et de viabilité (tests LDH et MTT) ont été réalisés sur les différents extraits lipidiques et ESM% (Ln, Lc, ESMr et ESMm).

Le test au MTT (Mosmann 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Ce test est utilisé pour comparer l'effet toxique des molécules testées.

VI.2. 8. a. Test MTT

Pour chaque temps étudié, 20 µl de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml dans du PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 4h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, le milieu est jeté puis ajouter 200µl de DMSO afin de lyser les cellules et incuber 5min à 37°C.

L'absorbance est mesurée à 550 nm, par un lecteur de plaques.

VI.2.8. b. test LDH

Le principe du dosage LDH est de déterminer le taux de mortalité d'une population cellulaire. Une augmentation de la quantité de cellules mortes ou dont la membrane est endommagée entraîne une augmentation de l'activité enzymatique LDH dans le surnageant. Cette enzyme réduit le sel de tétrazolium INT (jaune) en formazan (rouge). La quantité de formazan formée est directement proportionnelle au nombre de cellules lysées.

Réaliser l'ensemencement cellulaire d'une plaque de culture la veille du traitement. Traiter ensuite ces cellules avec les molécules dont la toxicité est à évaluer. Le traitement est réalisé 24 à 48h avant la réalisation du test LDH. Le volume par puits est de 200µl.

L'ensemencement de deux puits, en triplicat, par des cellules qui ne sont pas traitées, permettra de constituer les contrôles positifs et négatifs, respectivement « high control » et « low control ». Du milieu, déposé en triplicat, dans des puits non ensemencé, permettra de constituer le contrôle du bruit de fond du au milieu de culture ou « background ».

Pour réaliser le « high control », lyser les cellules par l'ajout de 4µl de solution triton 100x. Mélanger soigneusement ensuite transférer chaque surnageant de culture dans un tube eppendorf. Réaliser une centrifugation, 5min à 1000rpm puis transférer 100µl de chaque surnageant cellulaire pour chaque condition dans un puits de plaque 96 puits, puis ajouter 100µl de réactif de détection dans chaque puits. Incuber 30min à température ambiante à l'abri de la lumière. Et enfin lire la plaque sur lecteur de microplaque à 490nm.

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Valeur expérimentale} - \text{low control}}{\text{High control} - \text{low control}}$$

VII. Histologie

VII.1. Coloration Bleu Alcian

Le bleu alcian (Shukunami *et al.*, 1996) est un cation tétravalent (colorant basique) qui va révéler les fonctions acides ionisées -COOH et -SO₃H des GAGs (glycosaminoglycanes) au pH utilisé. Le Bleu Alcian met en évidence les GAGs par liaison saline. Il colore uniquement les polysaccharides sulfatés en bleu comme les GAG (sauf l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté). La coloration est spécifique pour les glycosaminoglycanes, dans la mesure où le colorant est utilisé à un pH acide (pH=2,6). Ils sont principalement situés à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire. Le cartilage en est composé en grande partie. La solution de bleu alcian utilisée qui se conserve *ad aeternam* est à 0,1% de bleu Alcian 8GX dans HCL 0,1M. Les cellules sont fixées avec de l'éthanol 70% pendant 30 min puis rincez les cellules en H₂O, 2 fois 30 secondes. La solution de bleu Alcian est ajoutée (coloration allant de 15min à toute la nuit en fonction du temps de coloration). Les cellules sont de nouveau rincées en H₂O, 2 fois 30 secondes (conserver en H₂O) et la plaque est prise en photo après séchage à température ambiante.

VII.2. Coloration rouge Alizarine

L'Alizarine (ou Rouge mordant) (Dahl, 1952) est un pigment rouge d'origine végétale, qui est utilisé pour déterminer quantitativement par colorimétrie, la présence de dépôts calciques par les cellules de la lignée osseuse. L'augmentation de la minéralisation est proportionnelle à l'intensité de la coloration rouge. La solution de rouge alizarine est à faire extemporanément. C'est une solution de Rouge alizarine à 1% en H₂O ajusté à pH 4,1-4,3 avec une solution ammonium hydroxyde de 0,1% sous agitation. Les cellules sont fixées avec de l'éthanol 70% pendant 30 min puis rincées en H₂O, 2 fois 30 secondes. La solution de Rouge Alizarine (1mL) est ajoutée (coloration 30 sec à 5 min).

Ensuite l'excès de colorant est retiré à la pipette quand la coloration est développée. Les cellules sont rincées en H₂O, 5 fois 30 secondes. Et la plaque est prise en photo après séchage à température ambiante.

VII.3. Coloration rouge Sirius

Le Rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène. La coloration au Rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide picrique à 0,1 %. Les cellules sont fixées avec de l'éthanol 70% pendant 30 min puis rincées en H₂O, 2 fois 30 secondes. La solution de Rouge Sirius (1mL) est ajoutée (coloration jusqu'à 30 min à température ambiante). Ensuite l'excès de colorant est retiré à la pipette quand la coloration est développée. Les cellules sont rincées en H₂O, 3 fois 30 secondes. Et la plaque est prise en photo après séchage à température ambiante.

Les colorations au Rouge Sirius, au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine sont utilisées respectivement pour visualiser le collagène, les GAGs et les dépôts calciques.

VIII. Biologie Moléculaire

VIII.1. Extraction des ARN totaux avec le kit *RNeasy Plus* (QIAGEN)

Ajouter le tampon de lyse RLT (qui contient 10 μ L de β -mercapto-éthanol/mL) dans chaque puits : Pour une surface < 6 cm => 350 μ L tp RLT+ β -mercapto-éthanol Pour une surface > 6 cm => 600 μ L tp RLT+ β -mercapto-éthanol Il faut faire des mouvements de balancelle pour que le tampon recouvre toute la surface et laisser quelques minutes. Effectuer des aspiration-refoulement ou *flush* 2 à 3 fois avec une p1000 puis aspirer le lysat et le déposer dans la colonne *gDNA eliminator* (qui présente un disque violet). Centrifugation 30 secondes, à 10 000 rpm. Après avoir jeté la colonne *gDNA eliminator* qui contient l'ADN génomique dans une poubelle spéciale pour les déchets de β -mercapto-éthanol, ajouter un volume d'éthanol à 70% à l'éluat. (1 volume : si tampon RLT+ β -mercapto-éthanol = 350 μ L ajouter 350 μ L d'éthanol à 70%) et flush 2 à 3 fois. (Cette étape est importante car l'éthanol modifie la conformation de l'ARN afin qu'il puisse se fixer sur la prochaine colonne). Prélever l'éluat (700 μ L ou 1200 μ L suivant le cas) et le déposer dans la colonne RNeasy. Centrifugation 15 secondes, 10 000 rpm, puis rejeter l'éluât. Ajouter 700 μ L de tampon RW1 qui a pour rôle de retirer les sels et les débris cellulaire car sels + alcool + ARN = précipité, donc c'est une étape de lavage. Centrifugation 15 secondes, 10 000 rpm, rejeter l'éluât. Ajouter 500 μ L de tampon

RPE (étape de lavage), centrifugation 15 secondes 10 000 rpm, rejeter l'éluât, puis ajouter de nouveau 500 µL de tampon RPE (lavage) centrifugation 2 minutes à 10 000 rpm et rejeter l'éluât. Placer la colonne dans un nouveau tube propre (tube 2 mL sans capuchon), centrifugation 1 minute à 13 000 rpm (cette étape à pour but d'assécher la colonne pour enlever toutes traces de tampon RPE qui contient de l'éthanol et diminue la qualité de l'ARN). Jeter le tube de 2 mL et placer la colonne *RNeasy* dans un nouveau tube (tube 1,5mL avec capuchon), ajouter 30 ou 50µL de réactif *RNase-free water* directement au centre de la membrane de la colonne sans y toucher. Centrifugation 1 minute à 10 000 rpm, jeter la colonne *RNeasy*, l'ARN pur est élué au fond du tube. Placer le tube dans la glace en attendant de le doser ou le stocker à -80°C.

VIII.2. Dosage des ARN au NANODROP

Utiliser le logiciel ND-1000 V3, 5.2 et aller sur l'icône « acide nucleic »

Le système de rétention d'échantillon utilisé par le spectrofluorimètre NanoDrop permet l'analyse de volumes d'échantillons extrêmement faibles (1-2 microlitres). La concentration en ARN est donnée en ng/µL et des ratios d'absorbance sont aussi calculés comme A260/A280 pour voir la pureté de l'ARN.

VIII.3. Transcriptase inverse (RT)

Pour pouvoir effectuer la dernière étape qui est la PCR en temps réel, il nous faut de l'ADNc. La RT correspond à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN. La synthèse d'ADNc à partir d'ARN est catalysée par des transcriptases inverses. Ces enzymes sont des ADN polymérase ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire.

Composition tube PCR :

- Mix RT : 4 µL tampon rétrotranscriptase RT (5X) + 2 µL dNTP mélange des 4 désoxyribonucléotides A, T, G, C (5mM) + 1 µL M-MLV Rtase (200 U/µL) +2 µL DTT (100mM) + 1 µL hexaprimers (3µg/µL)

- Volume (µL) ARNt à prélever pour la quantité désirée

Exemple : après dosage nous savons que la concentration [ARNt] dans l'échantillon X = 250 ng/ μ L et pour commencer l'étape de rétrotranscription nous voulons 500 ng d'ARNt, nous prélèverons ainsi 2 μ L de l'échantillon X.

- (QSP) Quantité Suffisante Pour 20 μ L eau stérile

Centrifugation « full speed », mettre le tube 1H à l'étuve à 37°C, après 5 min à 95°C (pour détruire l'enzyme et les ARNm), ensuite le placer dans la glace quelques minutes et terminer par une centrifugation « full speed ». Conservation de l'ADN à -20°C

VIII.4. Polymérase Chaîne Réaction (PCR) en temps réel

Cette technologie est basée sur la détection des produits d'amplification rendue possible grâce à l'incorporation d'une molécule fluorescente dans le mélange réactionnel : la quantification de l'émission de ce rapporteur fluorescent (ici le SYBR® Green, un agent intercalant de l'ADN double brin) est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le SYBR® Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin.

La valeur Ct est définie comme le nombre de cycles auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence, situé dans la portion exponentielle de la courbe d'amplification. Ainsi, le Ct est d'autant plus faible que le transcrit est fortement exprimé. Les thermocycleurs utilisés sont équipés d'un dispositif de détection de fluorescence, lequel est contrôlé par un programme informatique qui quantifie et convertit le signal fluorescent en quantité d'amplicons. Cette technique peut également être utilisée pour mettre au point des amorces (détermination de la température optimale d'hybridation par gradient de température, réalisation de gamme de dilution).

Le rendement de l'extraction des ARN et la qualité de la rétrotranscription pouvant varier d'un échantillon à l'autre, ces derniers sont aussi analysés pour un gène de référence (à expression constitutive stable) tel que les gènes codant pour la β -actine ou la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou encore: le gène codant une protéine ribosomiale RPS29 qui sont appelés aussi gène de ménage, permettant de normaliser les taux d'ARN. Chaque produit d'ADN double brin est synthétisé à une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95 °C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de 55 °C ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La

température est ensuite élevée lentement à 95 °C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée : quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe. Ceci nous permet de vérifier la spécificité de l'amplification lors de la qPCR (un pic correspond à un gène amplifié sans produit aspécifique).

Les critères de sélection des amorces choisies, mis au point au laboratoire, sont multiples. La taille de l'oligonucléotide doit être comprise entre 18 et 20 pb. La distance entre les deux primers (5' et 3') doit être comprise entre 100 et 200 pb de façon à ne pas modifier l'efficacité de l'enzyme. Le pourcentage de GC doit être compris entre 40% et 60%. Il faut également s'assurer qu'il n'y ait pas d'hybridation possible avec d'autres séquences, (vérification sur Blast). Les mises au point permettent que pour chaque couple de primers, l'efficacité de PCR ϵ soit sensiblement la même afin de pouvoir comparer plus justement les différentes expressions.

Les séquences des amorces utilisées, ainsi que la température d'hybridation utilisée sont présentées dans le tableau VII et VIII.

Les PCR en temps réel ont été réalisées en plaques 12 puits pour les ATDC5 et en plaques 24 pour les MC3T3.

Programmation de la PCR en temps réel avec le logiciel StepOne Software v2.1 :

1) Réglage plaque : plaque 96 puits, choix de l'intercalant SYBRgreen, comparaison Ct 2)

Dessin des plaques : nom échantillon + gène testé à chaque puits 3) Réglage des cycles :

Dénaturation initiale 10 min à 95°C

Dénaturation 20 sec à 95°C : séparation des 2 brins d'ADN cycle X 40 Hybridation spécifique des amorces 20 sec aux t° optimales des amorces Elongation 20 sec à 72°C: l'enzyme Taq polymérase synthétise les brins d'ADN

L'analyse des résultats est fondée sur la méthode dite des Δ Ct (Livak et Schmittgen, 2001).

La valeur Ct obtenue pour le gène RPS29 (ou NADPH), dont l'expression est constante, est soustraite à la valeur Ct du gène d'intérêt pour chaque échantillon ; ceci définit le Δ Ct de l'échantillon. Le Δ Ct de l'échantillon de référence (contrôle J7 par exemple ou témoin non

traités par l'extrait lipidique) est alors soustrait aux ΔCt des échantillons pour obtenir le $\Delta\Delta Ct$. Puisque la quantité de copies d'ADN est multipliée à chaque cycle de la PCR par $(1+\epsilon)$ où ϵ est l'efficacité de cette dernière, la quantité relative d'ADN présente au départ dans l'échantillon par rapport à l'échantillon de référence est $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Le niveau d'expression des gènes utilisés pour les cellules ATDC5 de RP29 (gène de ménage ou gène de référence), Col 1A2, Col 2A1, Aggrécane, Col XA1 est analysé par PCR quantitative en utilisant les amorces décrites sur le tableau VII.

Tableau VII. Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour les ATDC5

Gènes	Orientations	Séquences de 5' vers 3'	Température d'hybridation (°C)
Aggrécane	Sens	GCTGCAGTGATCTCAGAAGAAG	60
	Anti-sens	GATGGTGAGGGAAGACCCTA	
Col 1 A2	Sens	CTCCAGCCTTTCCAGGTTCT	60
	Anti-sens	CTCCAGCCTTTCCAGGTTCT	
Col 2 A1	Sens	TGGTATTCCTGGAGCCAAAG	60
	Anti-sens	ACCAGTTGCACCTTGAGGAC	
Col X A1	Sens	TTCATCCCATACGCCATAAAG	58
	Anti-sens	AGGGACCTGGGTGTCCTC	
RP29 (ou gène de ménage)	Sens	GGAGTCACCCACGGAAGTT	60
	Anti-sens	GCCTATGTCCTTCGCGTACT	

Le niveau d'expression des gènes utilisés pour les cellules MC3T3 de GAPDH (gène de ménage), Osteopontine, Osteocalcine, Col1, RunX2 est analysé par PCR quantitative en utilisant les amorces décrites sur le tableau VIII.

Tableau VIII. Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour les MC3T3

Gènes	Orientations	Séquences de 5' vers 3'
Ostéopontine	Sens	GCAAGAAACTCTTCCAAGCA
	Anti-sens	AGATTCATCCGAGTCCACAG
Ostéocalcine	Sens	CTGGCTGCGCTCTGT
	Anti-sens	TTATTGCCCTCCTGCTT
Col I	Sens	GCGAAGGCAACAGTCGCT
	Anti-sens	CTTGGTGGTTTTGTATTC GATGAC
runx2	Sens	TCTGGCGTTTAAATGGTTAATCTC
	Anti-sens	CCCTCTGTTGTAAATACTGCT
GAPDH (ou gène de ménage)	Sens	TTC ATT GAC CTC AAC TAC AT
	Anti-sens	GAG GGG CCA TCC ACA GTC TT

IX.Méthodes d'analyse statistique

IX.1.Expression et interprétation statistique des résultats

Les analyses statistiques des données obtenues ont été effectuées par le logiciel XLSTAT version 7. 5. 2.

IX.1.1.Anova et Manova

La variation saisonnière des paramètres morphologiques, biométriques de l'espèce, de la composition biochimique en lipides: en acides gras des lipides totaux et des catégories lipidiques de la chair et de la nacre de *P.radiata* sont signalés en moyenne \pm écart-type. Après avoir vérifié la normalité, et si nécessaire faire la transformation des données selon la formule : LOG (N*100), nous avons donc adopté la méthode d'analyse de la variance ANOVA et MANOVA ($p < 0,05$) qui teste la signification des différences entre les moyennes et permet d'évaluer l'influence de la période d'échantillonnage sur les différentes analyses

faites dans ce travail de synthèse. Nous avons aussi confirmé nos résultats par l'utilisation d'un certain nombre de tests : Test LSD de Tukey, test HSD, test de Duncan, test de Scheffé. Le coefficient de corrélation de Pearson (r) a été utilisé aussi pour étudier les relations entre les principaux paramètres étudiés.

Le calcul du coefficient de corrélation (r) permet en outre de mesurer la relation linéaire (« proportionnalité ») entre les valeurs de deux variables ou paramètres.

Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SD. La moyenne est réalisée sur au moins quatre expériences différentes. Les points stimulés sont comparés aux points contrôles respectifs, et les calculs statistiques des différences de moyennes sont réalisés par l'utilisation du Test ANOVA, ou du test de Student t . Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative

IX.1.2. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Actuellement, l'analyse statistique multivariée est un outil incontournable pour étudier des données provenant de nombreuses observations faites sur plusieurs variables. Elle a pour but de résumer l'information contenue dans les données sur un nombre réduit de dimensions reflétant au mieux les proximités entre observations et/ou entre variables. Pour effectuer cette analyse, nous avons eu recours à l'Analyse en Composante Principale (ACP)

L'Analyse en Composante Principale (ACP) est une méthode appropriée aux données multidimensionnelles, lorsque toutes les variables observées sont de type numérique, de préférence dans les mêmes unités et que l'on veut voir s'il y a des liens entre ces variables. Cette technique s'avère donc une technique mathématique permettant de réduire un système complexe de corrélation en un plus petit nombre de dimensions.

L'ACP est donc une méthode de réduction du nombre de caractères permettant des représentations géométriques des individus et des caractères. Elle construit de nouvelles variables

artificielles et des représentations graphiques permettant de visualiser des relations entre variables ainsi que l'existence éventuelle de groupes d'individus et de groupes de variables.

C'est une méthode qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites "corrélées") en nouvelles variables indépendantes les unes des autres ("non corrélées"). Ces nouvelles variables sont nommées "composantes principales", ou axes. L'ACP permet de réduire l'information en un nombre de composantes plus limité que le nombre initial de variables.

Il s'agit d'une approche à la fois géométrique (représentation des variables dans un nouvel espace géométrique selon des directions d'inertie maximale) et statistique.

(recherche d'axes indépendants expliquant au mieux la variabilité - la variance - des données).

En général, la réduction du nombre de variables, utilisées pour décrire un ensemble de données, provoque une perte d'information. L'ACP procède de façon à ce que cette perte d'information soit la plus faible possible (Palm, 1998 ; Baccini, 2010).

L'Analyse en Composantes principales peut donc être vue comme une technique de réduction de dimensionnalité et a pour objectif aussi de déterminer des représentations graphiques planes, appelées cartes, sur les axes factoriels pris deux à deux. Ces représentations permettent d'analyser au mieux les proximités (corrélations) et les écarts entre les différentes variables. En particulier, elles doivent permettre d'isoler les individus « atypiques » et de regrouper les individus « semblables » dans notre travail il s'agit de six individus par saison.

Mathématiquement, la détermination des axes factoriels se fait par diagonalisation de la matrice de variances-covariances, d'où le vocabulaire utilisé (valeurs propres, vecteurs propres).

La première Composante principale (CP1) recueille la partie majeure de la variation dans l'ensemble de données. En termes mathématiques, les CP sont les valeurs propres de la matrice de corrélation et la technique qui permet de trouver ces valeurs propres est appelée l'analyse propre. A Chaque CP (chaque vecteur propre) correspond une valeur propre qui donne la quantité de variance de l'ensemble des données expliquée par cette composante (Vandeginste *et al.*, 1998). Selon kaiser (1970), le critère « absolu » de choix de l'axe factoriel est de ne retenir que les axes dont les valeurs propres sont supérieures à 1.

Le 1^{er} axe factoriel, ou axe principal d'inertie, est la direction de "plus grand allongement" du nuage (en statistiques on dit : "de plus grande dispersion" ou "de plus grande inertie" du nuage) (Raffestin, 2005). L'axe factoriel F1 est donc l'axe selon lequel est préservé, par projection, le maximum de la dispersion initiale des points du nuage.

le 2^{ième} axe factoriel est la deuxième direction d'allongement du nuage, c'est-à-dire celle qui explique, après le 1^{er} axe, le maximum de l'inertie résiduelle. L'axe factoriel 2 est orthogonal au 1^{er}, ce qui traduit le fait que la 2^{ième} composante principale est non corrélée à la première.

Comme précédemment, on cherchera à donner un sens à cette 2^{ième} composante principale, en observant comment elle combine les variables de départ, et ainsi de suite, jusqu'à avoir remplacé les m anciens axes par m nouveaux axes (les axes factoriels), portant des parts décroissantes de la dispersion initiale et dont les 2, 3 ou 4 premiers suffisent souvent à donner une image à peine déformée du nuage initial (Raffestin, 2005).

Les mappings de l'ACP sont les projections des variables et des individus sur un plan factoriel déterminé. On commencera par interpréter le premier plan factoriel (celui formé par les facteurs F1 et F2) car c'est celui qui concentre la plus grande partie de l'information du nuage. Sur un plan factoriel, on n'interprète que les variables et les individus qui sont bien représentés. Pour les individus, on utilisera les contributions absolues et relatives alors que pour les variables, on n'interprètera que celles qui sont proches du cercle de corrélation et dont l'indice KMO (Kaiser-Meyer- Oklin) est supérieur à 0,7.

Partie III

Résultats et discussions

Introduction

Un pré-requis essentiel pour toute étude de la composition en acides gras de bivalves marins est la connaissance de certaines caractéristiques de leur composition lipidique détaillée « de base », qui est à ce jour inconnue. Et portant notre intérêt sur l'ostéogénie de la nacre de l'espèce *Pinctada radiata* et son potentiel de substitution osseuse, il nous est apparu essentiel d'étudier en parallèle la composition en acides gras de sa chair afin de comparer les profils saisonniers et voir leur relation. Le but est de compléter si nécessaire avec les acides gras de la chair en culture cellulaire et d'essayer de comprendre la composition saisonnière en acides gras de la chair et de la nacre en comparant ses deux profils. A notre connaissance, les informations concernant la composition en acides gras chez *P. radiata* sont très peu présentes dans le monde et absentes sur les côtes de la Tunisie.

Dans le cadre de l'étude de la composition lipidique de l'huître perlière *P. radiata* associée à la nutrition, il apparaît que seule la composition en acides gras de l'espèce *P. radiata* au niveau des côtes tunisiennes et même au niveau de la méditerranée n'a pas été étudiée. Il s'agit plus particulièrement de ses lipides polaires et des catégories lipidiques qui sont liés à sa richesse en tant que source d'oméga 3 et 6. Une étude des caractéristiques de la composition lipidique chez l'espèce bivalve l'huître perlière *P. radiata* fait l'objet du premier chapitre, ainsi que sa composition saisonnière en protéines et de sa teneur en eau.

Une investigation saisonnière de la composition élémentaire (teneur en matière sèche, teneur en cendres, protéines et lipides) de l'espèce *P. radiata* a été faite au niveau de la baie Maden du golf d'Antalya de la Turquie (Nalan G, 2006). Il existe plusieurs études :

- sur la structure et les modes de variation génétique de la population de *Pinctada radiata* au niveau du golf de l'Arabie Saoudite (Amal Al-Saadi, 2013),
- une étude sur l'introduction de l'espèce invasive au niveau des côtes d'Israël (Bella S. Galil ; 2007),
- et une étude sur l'analyse morphométrique de la population de cet espèce au niveau des îles de Malte (Alan D *et al.*, 2014).

En Tunisie jusqu'à nos jours, une seule étude biologique portant sur la reproduction de cette huître récoltée autour des îles de Kerkennah a été effectuée (Zouari et Zouali, 1994 et Tlig-

Zouari ; 2009). En se basant sur des études récentes sur la répartition et la densité de cette espèce dans le nord et l'est tunisien (Tlig-Zouari ; 2009) et dans le sud (Derbali *et al.*, 2011). Il nous est alors paru intéressant d'étudier la composition lipidique de sa chair. Il s'agit des lipides polaires et plus particulièrement les catégories lipidiques appelées les glycérophospholipides (PE, PI, PS et PC) en tant que source d'oméga 3 ainsi que la composition en acides gras totaux et particulièrement les catégories lipidiques de la nacre qui entrent dans la composition de la membrane cellulaire. Ce dernier est considéré comme un biomatériau potentiel de substitution osseuse. Afin de promouvoir les intérêts de la nacre de *P. radiata*, des investigations sont possibles sur la création d'un biomatériau implantable pour l'homme. Il s'agit d'une première étude sur *P. radiata*.

En Tunisie une investigation a été réalisée sur les caractéristiques mécaniques et physico-chimiques de la nacre exploités en tant que substitut osseux (Hamza *et al.*, 2007), sur la morphologie de la coquille et de la variabilité de la croissance relative de la nacre de *P. radiata* en Tunisie. Bellaaj-Zouari *et al.* (2011) ont montré la caractérisation physique et chimique des protéines adsorbées sur la fonctionnalité sur électrode d'or avec le corail et de la nacre tunisienne (Hamza *et al.*, 2013).

La plupart des études sont consacrées à des protéines, malgré que les sucres ont été décrits. À notre connaissance, la composition en acides gras de la nacre des bivalves mollusques n'a pas encore été étudiée. Rousseau *et al.* (2006) montre pour la première fois la présence de lipides dans la nacre démontrant que les lipides de la nacre sont efficaces dans la réparation de la barrière lipidique de la peau et qu'il pourrait compléter le déficit en lipides de la couche cornée. Farre *et al.* (2009) ont déjà caractérisé la composition biochimique des lipides de l'enveloppe de couche nacrée de *Pinctada margaritifera* (lipides totaux, lipides polaires (phospholipides et pigments), des stérols (cholestérol) et de triglycérides (trioléine)), sans préciser le profil des différents acides gras.

Rappelant que les protéines transmembranaires traversent les deux feuillettes de la membrane. Ces protéines sont liées de manière stable à la membrane avec l'environnement hydrophobe de la face interne de la membrane, par les acides aminés apolaires de leurs hélices α . Elles ne peuvent ainsi être séparées de la double couche phospholipidique. GPR40 est un récepteur protéique transmembranaire sur lequel certains acides gras viennent se fixer, ce qui engendre

un signal cellulaire GPR40 (fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G). En effet, Wauquier *et al.*, 2014 avaient montré que Le récepteur lipidique GPR40 joue un rôle clef dans la protection du squelette, en maintenant la densité minérale osseuse. GPR40, un récepteur aux acides gras, a été découvert sur la membrane des cellules osseuses impliquées dans le remodelage osseux. Wauquier *et al* (2014) ont découvert qu'il était aussi localisé sur la membrane des cellules osseuses impliquées dans le remodelage osseux : les ostéoclastes. Ils ont mis en culture des cellules de moelle osseuse, de manière à isoler les ostéoclastes et leurs précurseurs cellulaires. Lorsque les récepteurs GPR40 de ces cellules sont stimulés, la différenciation cellulaire des ostéoclastes est inhibée. L'os est donc moins résorbé, ce qui freine la perte osseuse.

A partir de ces données notre travail nous procure une idée sur la composition en AG particuliers, qui pourront être à l'origine de l'ostéointégration des extraits lipidiques de la nacre aux différentes cellules qu'il s'agit bien l'étude des effets des lipides de la nacre ou de la chair sur les préostéoblastes MC3T3 et les préchondrocytes ATDC5 à travers la culture cellulaire et la biologie moléculaire.

Dans les chapitres se rapportant à la composition des lipides de la chair et de la nacre de *P.radiata* nous nous proposons de suivre l'évolution au cours du temps des proportions des lipides totaux, des lipides polaires ainsi que celles des différentes catégories lipidiques.

En fonction de leur affinité pour certains solvants en chromatographie liquide, les lipides peuvent se subdiviser en deux grandes classes : les lipides neutres (LN) et les lipides polaires (LP). Cette subdivision, bien qu'assez imprécise, est très largement utilisée dans la littérature, dans la mesure où elle se retrouve lors des séparations méthodologiques. Il a été aussi proposé d'utiliser les termes lipides simples (après hydrolyse donnant au plus deux constituants primaires par mole) et lipides complexes (après hydrolyse, trois (ou plus) constituants primaires par mole), ou bien les termes lipides de réserve et lipides membranaires.

Dans le présent travail, nous nous intéressons seulement aux lipides polaires plus particulièrement les glycérophospholipides d'un côté en vue de leur importance au niveau de la qualité nutritionnelle de la chair de ce bivalve et d'un autre côté sur le rôle joué par ces lipides dans l'ostéogénie. Parmi les lipides polaires, on trouve les sphingolipides (SL) et les glycérophospholipides (PE, PI, PS et PC).

Le premier chapitre concerne la variation saisonnière de la composition biochimique de la chair de *P. radiata* de la zone de Maharès.

La première partie de ce chapitre est dédiée à l'étude de la caractérisation lipidique de l'espèce sauvage *P. radiata* dans la région sud-est de la Tunisie. Il s'agit de la variation saisonnière de la composition en acides gras totaux de la chair et sa corrélation avec les principales catégories lipidiques qui sont à l'origine de la richesse de cette espèce en tant que source d'oméga 3 et 6.

La seconde partie de ce chapitre présente les résultats obtenus pour les différentes catégories lipidiques, ainsi que sa composition en protéines et teneur en eau.

Le deuxième chapitre est dédié à l'étude de la qualité et à la composition biochimique de la nacre de *P. radiata* au niveau de la région de Maharès et insiste plus particulièrement sur la variation de la composition en acides gras de la nacre, ses acides gras totaux, sa composition en acides gras de ses catégories lipidiques.

Enfin, le troisième chapitre porte sur l'étude des effets des lipides de la nacre et de la chair sur les cellules MC3T3 et ATDC5 par la culture cellulaire et la biologie moléculaire.

Chapitre I

Variations saisonnières de la composition biochimique de la chair de *Pinctada radiata* dans la zone de Maharès

A. Variations saisonnières de la composition biochimique de la chair de *Pinctada radiata* dans la zone de Maharès

A.I. Variations saisonnières de la teneur en eau chez *Pinctada radiata*

La teneur en eau a été évaluée suite à une incubation à 105°C pendant 24 h. Les résultats obtenus sont décrits dans la figure 57.

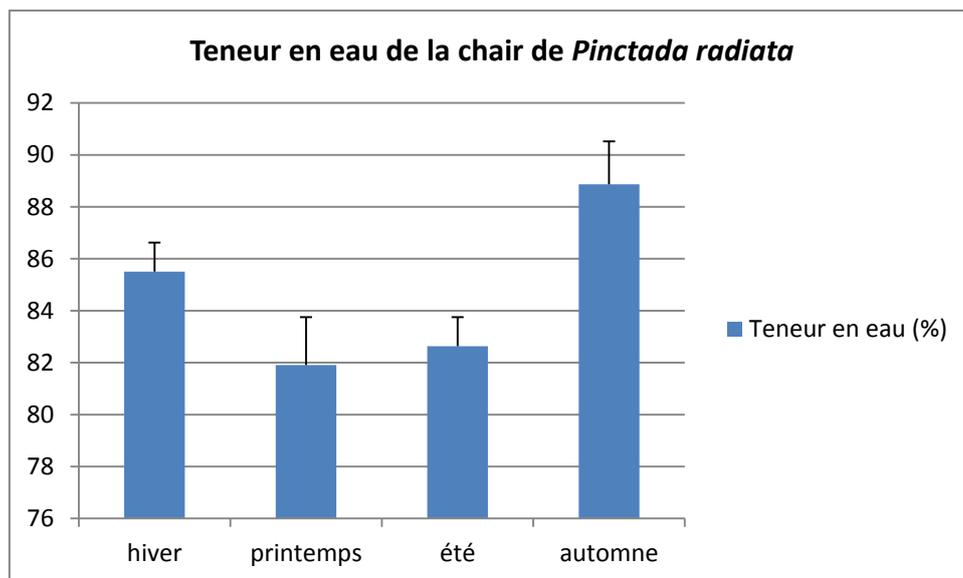


Figure 57. Variations saisonnières de la teneur en eau chez *P. radiata*

Nous remarquons que la teneur en eau chez *Pinctada radiata* varie entre une valeur minimale de 81,9% au printemps et une valeur maximale de 88,86% en automne. La variation saisonnière de la teneur en eau ne présente pas une différence significative durant toute l'année. La teneur la plus faible en eau est enregistrée pendant le printemps, ensuite, elle augmente en été et elle atteint finalement une valeur maximale en automne.

A.II. Variations saisonnières de la teneur en protéines totales chez *Pinctada radiata*

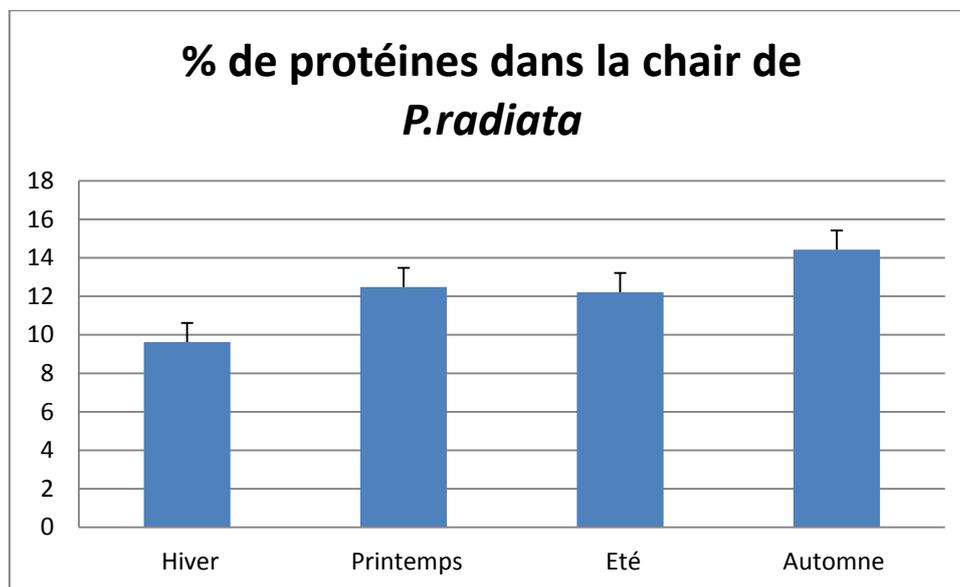


Figure 58. Variations des pourcentages moyens des protéines totales de la chair de *pinctada radiata* en fonction des saisons.

Les variations saisonnières des taux de protéines totales (exprimées en % correspondant à la masse en g/100g de matière sèche) dans la chair de *P. radiata* au niveau de la station de Maharés sont représentés dans la figure 58. Le taux des protéines diffère d'une saison à l'autre. On enregistre (9,62±2,47%) en hiver, (12,48 ±4,27) au printemps, (12,21±2,23%) en été et (14,42±2,47%) en automne. Le taux de protéine en hiver diffère significativement de ceux enregistrés dans le reste des saisons. La valeur la plus élevée a été signalée en automne (14,42±2,47%).

Contrairement à la saison d'automne, la teneur de la chair en protéines baisse significativement en hiver et ne présente pas de différence significative du taux de protéine entre le printemps et l'été.

A.III. Variations saisonnières de la composition en acides gras totaux chez *Pinctada radiata* : Importance des lipides et apports nutritionnels

A.III. 1. Analyse des résultats

Nous avons étudié les variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides totaux de *P. radiata* récoltés durant la première campagne de pêche (2011-2012) à Maharès au niveau de la région sud-est tunisienne afin de fournir des informations sur la qualité des lipides de cette espèce. Les résultats de l'analyse des acides gras présentés dans l'annexe (1) ont révélé que le contenu des lipides totaux était de 79,61-400,21mg/100g dans les différentes saisons. La teneur en lipides était légèrement plus élevée (334,28-400,21mg/100g) pendant la saison de reproduction (Février et mai) ($p < 0,05$) que durant la saison de croissance Novembre et Août (79,61-187,06mg/100g).

Les acides gras saturés prédominent en hiver (214,06 mg/100 g), les niveaux les plus bas ont été trouvés à la fin de l'automne et au début de l'été. Les acides gras polyinsaturés ont subi des variations (34,77 à 149,82mg/100g) et ont montré une tendance saisonnière semblable aux niveaux de la teneur totale de n-3 et de n-6 (bas en hiver), puis a augmenté de manière significative entre le printemps et la saison d'automne ($p < 0,05$).

Les changements saisonniers dans les acides gras mono-insaturés sont moins importants (6,90 à 36,32mg/100g).

Les plus importants acides gras saturés sont: C14:0 (5,79 à 6,06%), C16:0 (de 25,76 à 34%) et C18:0 (de 8,71 à 12,65%) et les acides gras mono-insaturés: C16:1 (3,59 à 4,56%), C18:1n-9 (2,32 à 4,01%) et C20:1 (de 0,13 à 1,4%) ont montré des profils saisonniers similaires.

Les acides gras polyinsaturés les plus abondants (AGPI) sont les suivants: C20:5 (n-3) (4,18 à 5,78%), C22 :6 (n-3) (13,94 à 16,04%) et de 18:4 (n-3) (de 0,25 à 1,01%). Les profils saisonniers de ces acides gras étaient similaires à ceux des AGPI. Les (n-6) AGPI contiennent des pourcentages élevés de 20:4 (n-6) que de 18:2 (n-6) et les variations saisonnières de ces dernières suivent celle de (n-3) AGPI de très près.

Les pourcentages des AGPI de la série n-3 étaient significativement élevés que ceux des AGPI de la série n-6 ($p < 0,05$) (Annexe.I). Nous avons remarqué aussi la présence de non-interrompue méthylène diénoïque (NMID) (C22: 2) : C22: 2i (0,40% et 1,59) et C22: 2j (0,07% et 0,30%) en petites quantités.

A.III.2. L'analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) de la variation de la composition en acides gras chez *P. radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons (Fig.59, Tab.IX) a montré que le pourcentage d'inertie expliqué par les deux premiers axes est de 35,29% avec 19,06% pour l'axe 1 et 16,23 % pour le second selon le plan factoriel (1 ×2).

Selon le plan factoriel (1 ×3), le pourcentage d'inertie expliqué par les deux premiers axes est de 31,82 % avec 19,06% pour l'axe 1 et 12,76% pour le second (Fig. 60, Tab.IX). L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 67,11% de la variance totale.

Selon l'axe factoriel (1 ×2), le premier axe oppose les acides gras C20:5n-3(EPA), C20:4n-3, C22:6n-3(DHA), C16:0, C18:3n-3 aux C20:2n-6, C15:0, C20:4n-6 (ARA), C22:5n-3, C18:0. Sur l'axe factoriel 2, les C20:2n-6 et C22:6n-3 forment les acides gras qui possèdent les plus fortes inerties.

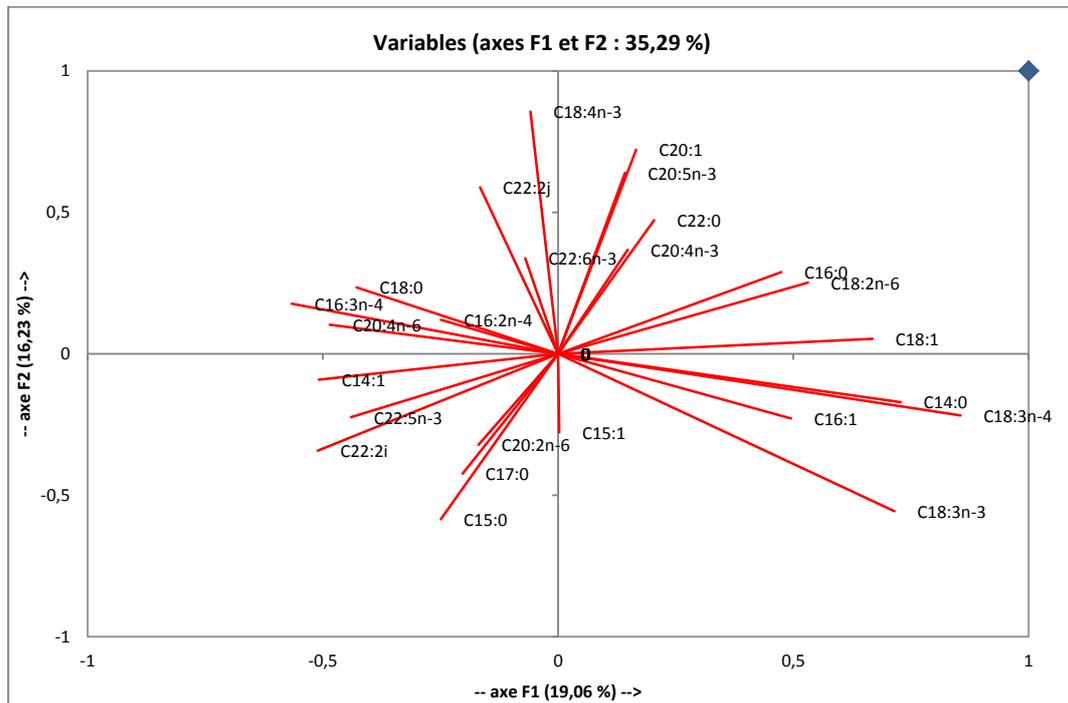
La projection des individus sur le plan factoriel (1 ×2) montre que sur l'axe 1, les pourcentages de C22 :0 , C18 :0 de l'EPA du DHA et de l'ARA, sont significativement plus important durant l'hiver (les individus: 2,5,4,6,1 et 3) et un individu prin (05) , et suivent une évolution inverse à celle des acides C14:1, C20 :2n-6, C17 :0, C22 :5n-3 et C15 :1 et qui seront plutôt accumulés dans la chair de ce bivalve durant la saison d'automne(05) et (01) et (06) et d'été (01).

La corrélation positive de C20 :2n-6 à l'axe 3 coïncide avec une élévation de ces derniers en hiver (04) alors que celle du l'EPA a eu lieu durant l'automne (05) contribuant ,négativement à l'axe factoriel 1 selon le plan factoriel (1 ×3), également le regroupement des acides gras saturés comme C14 :0, C15 :0, C16 :0, C17 :0 et C18 :0 durant la saison d'automne et corrélaté négativement à la composante principale (1).

Tableau IX. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (AGT).

Chair (AGT)	F1	F2	F3
Valeur propre	4,76	4,057	3,19
Cumuls de la variance expliquée (%)	19,06	35,29	48,05

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

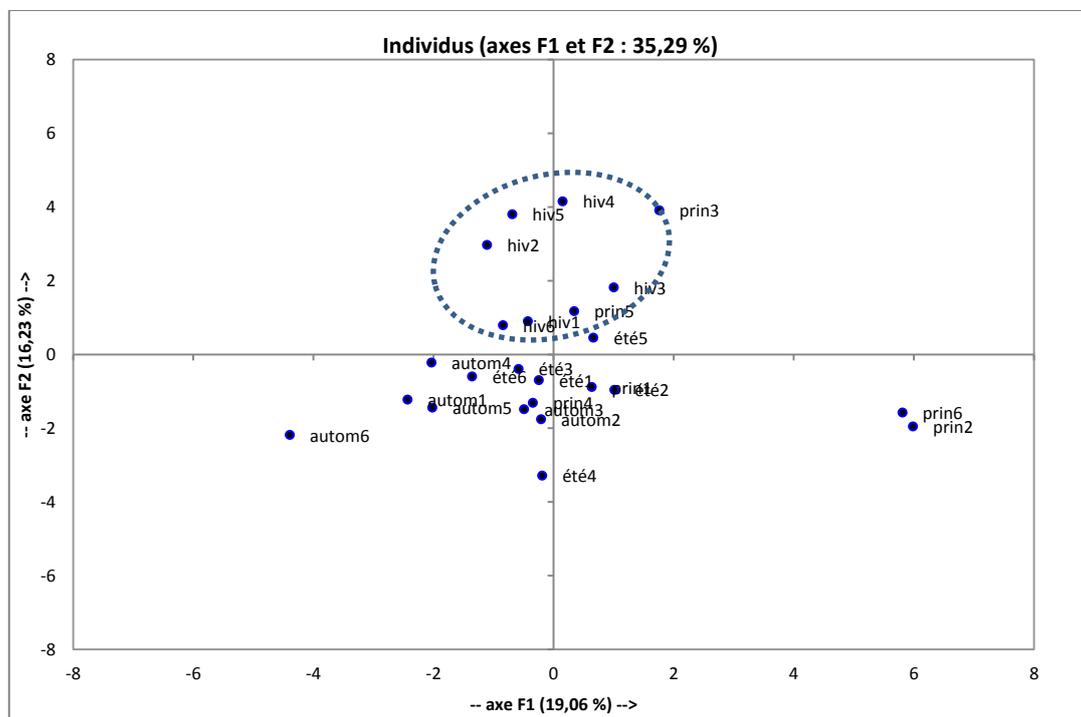
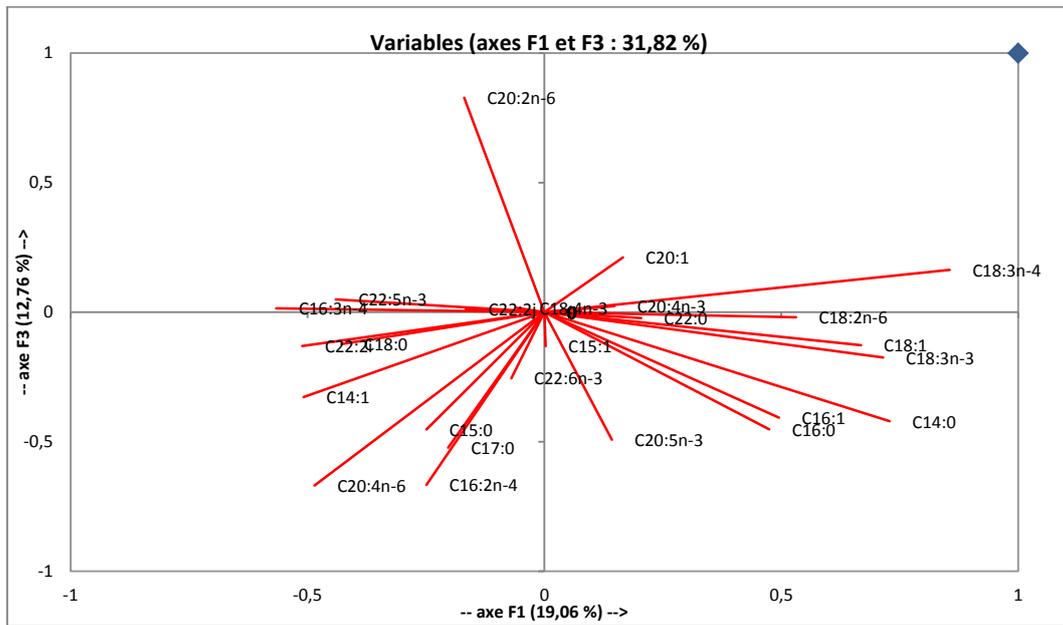


Figure. 59 Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras totaux de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

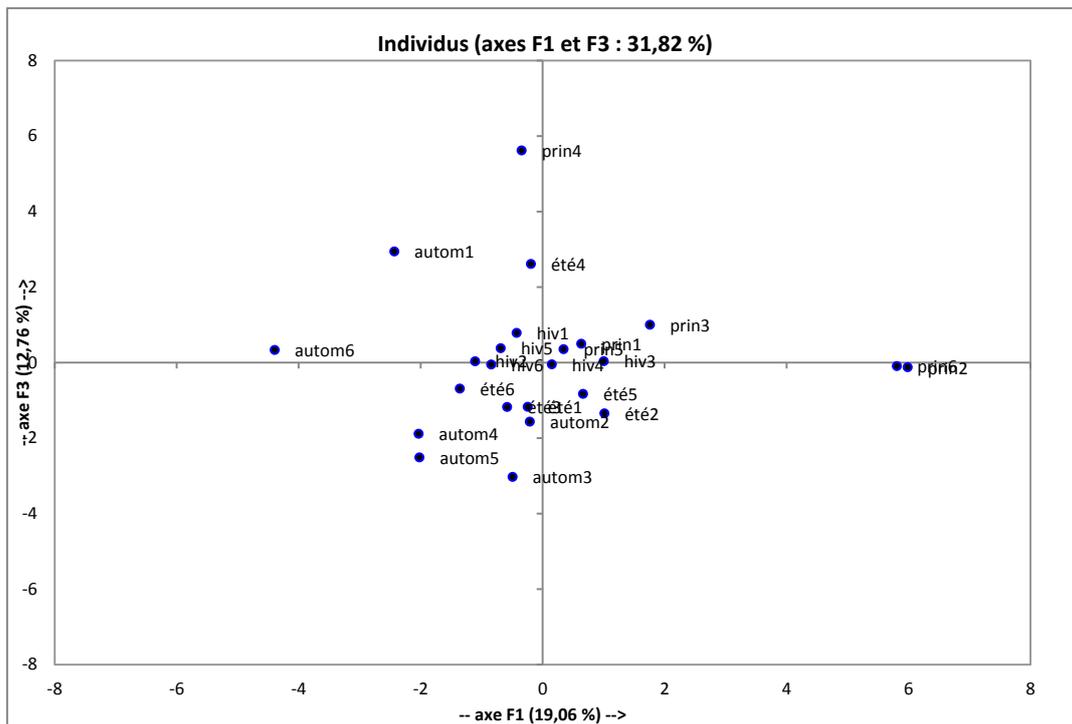


Figure 60. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras totaux de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

A.IV. Variations saisonnières de la composition en acides gras des catégories lipidiques essentielles de la chair de *P.radiata*.

A.IV.1. Variations saisonnières de la composition en acides gras des phosphatidylcholines (PC) de la chair de *P.radiata*.

A.IV.1. a. Analyse des résultats

L'analyse de la composition en acides gras des catégories phospholipidiques PC ou lécithine des lipides totaux extraits à partir de la chair de *P.radiata* a montré une prédominance durant toute l'année d'étude des acides gras insaturés (AGI) par rapport aux acides gras saturés (AGS) (Annexe 2).

Six acides gras majeurs avec des variations significatives ($p < 0.05$) ont été identifiés au sein de la PC durant les quatre saisons (Annexe 2). Parmi les AGS, on a retenu le C16 :0 (27,5-39,29%) et le C18 :0 (5,97-7,98%). Le C16 :1n-7 (1,75-7,88%) prédomine parmi les AGMI. Le C20 :4n-6 (3,21-4,37%) est le représentant principal des AGPI (n-6). Il en est de même pour EPA (2,75-6,98%) et le DHA (10,45-22,93%) parmi les AGPI (n-3).

En plus des six acides gras majeurs identifiés au niveau de la PC, on a déterminé deux autres acides gras majeurs chez la PE à savoir le C14 :0 (1,45-10,98%) et le C22 :1n-9 (1,17-8,72%)

Les niveaux les plus élevés d'AGPI de PC ont été enregistrés entre le milieu de l'été (Août) et la fin de l'hiver (Février) ($p < 0,05$), puis ont légèrement diminué et sont restés faibles pendant l'automne et le printemps.

L'AGPI de PC a montré une relation significative avec les changements saisonniers de la série n-3 des PC décroît de 25,03 au début de l'étude (Février) jusqu'à 11,25mg/100g au mois de mai, restant faible jusqu'à aout 1,74 mg/100g et enfin il augmente jusqu'au mois de Novembre 5,40 mg/100g.

A.IV.1. b. L'analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) de la variation de la composition en acides gras des PC chez *P. radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons (Fig.61, Tab X) a montré que le pourcentage d'inertie expliqué par les deux premiers axes est de est de 49,15% avec 29,28% pour l'axe 1 et 19,87 % pour le second selon le plan factoriel (1×2).

Selon le plan factoriel (1 ×3), le pourcentage d'inertie expliqué par les deux premiers axes est de 42,70% avec 29,28% pour l'axe 1 et 13,42% pour le second (Fig .62, Tab X). L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 91,85% de la variance totale.

Selon l'axe factoriel (1 ×2), le premier axe oppose les acides gras C20:5n-3(EPA), C20:4n-3, C22:6n-3(DHA), C22:5n-3, C18:3n-3, C22 :3n-3 aux C16:0,C14 :0, C20:2n-6, C15:0, C20:4n-6 (ARA), C18:0. Sur l'axe factoriel 2, les C16:1 et C22:6n-3 forment les acides gras qui possèdent les plus fortes inerties. Quant à l'axe F2, absorbant 19,87% de la variabilité, sélectionne négativement les acides gras saturés et positivement les acides gras polyinsaturés de la série n-3.

Ces différentes variables sont essentiellement associées à la projection des différents individus présentant les différentes saisons

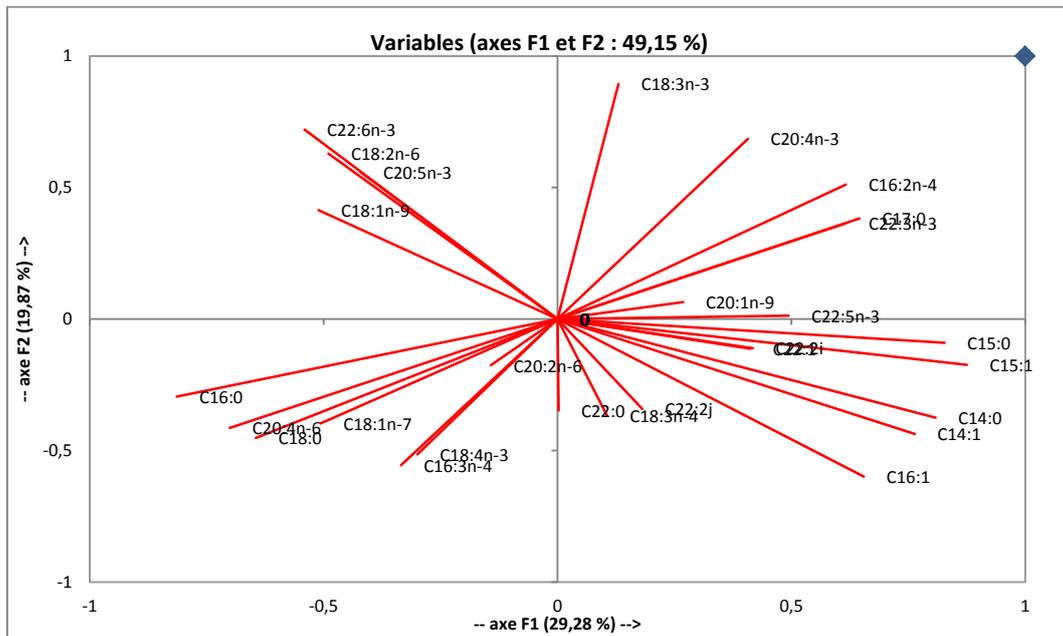
La projection des individus sur le plan factoriel (1 ×2) montre que sur l'axe 2 sélectionne positivement les pourcentages de l'EPA et du DHA qui sont significativement plus important durant l'hiver, et sélectionne négativement l'ARA, C16 :0, C18 :0, C18 :4n-3 avec un pourcentage important durant la saison du printemps.

L'axe 1 sélectionne positivement les pourcentages surtout les AGPI de la série n-3qui se regroupent essentiellement en été comme C22 :3n-3 et C22 :5n-3 (acides gras qu'on trouve surtout au niveau des catégories lipidiques majeurs) et sélectionne négativement surtout les acides gras monoinsaturés se regroupant en automne. Selon le plan factoriel (1×3), l'axe F3, absorbant 13,42% de la variance, sélectionne positivement le groupe hiver montrant sa richesse en acides gras essentiels : EPA, DHA et ARA et groupe les deux saisons printemps et été avec un pourcentage important en C16 :0, C18 :0, C18 :4n-3, C18 :2n-6, C18 :4n-3 et C20 :2n-6.

Tableau X. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (PC).

Chair (PC)	F1	F2	F3
Valeur propre	8,19	5,56	3,75
Cumuls de la variance expliquée (%)	29,28	49,14	62,57

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

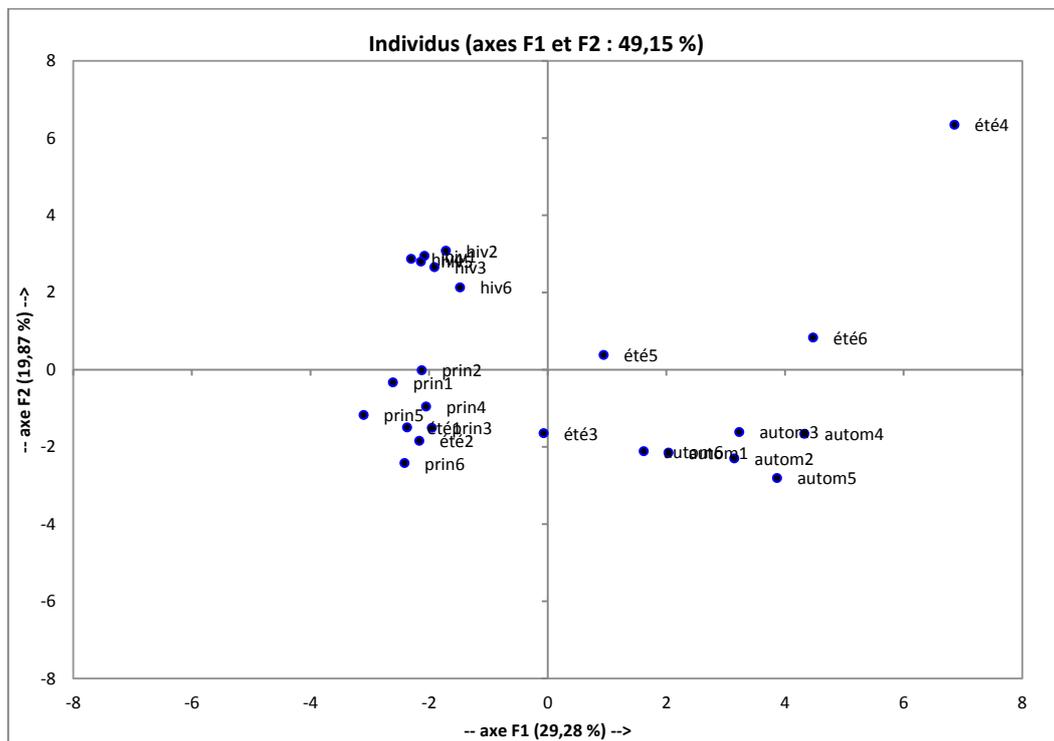
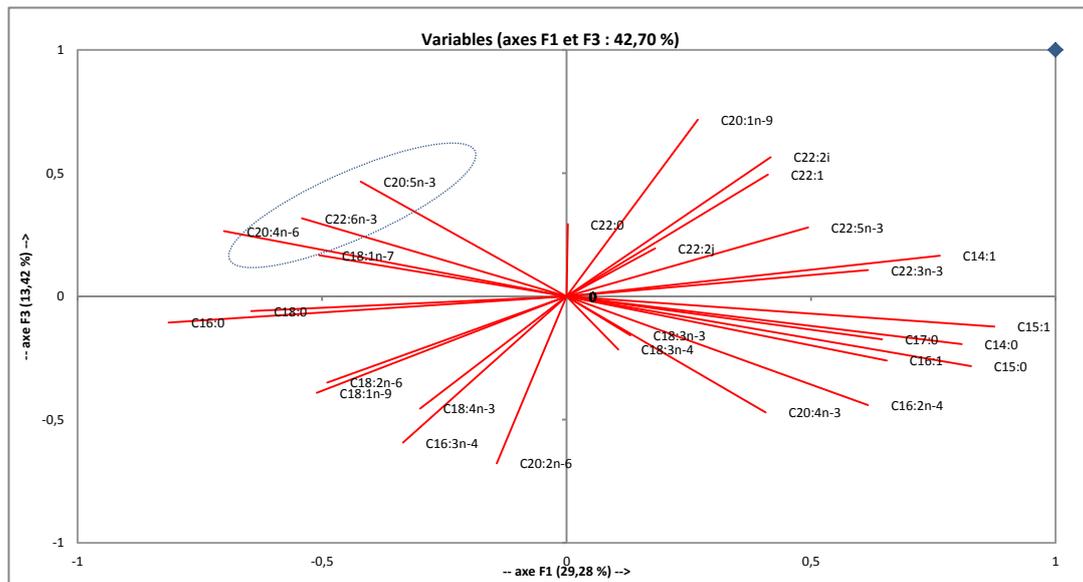


Figure. 61 Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PC de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

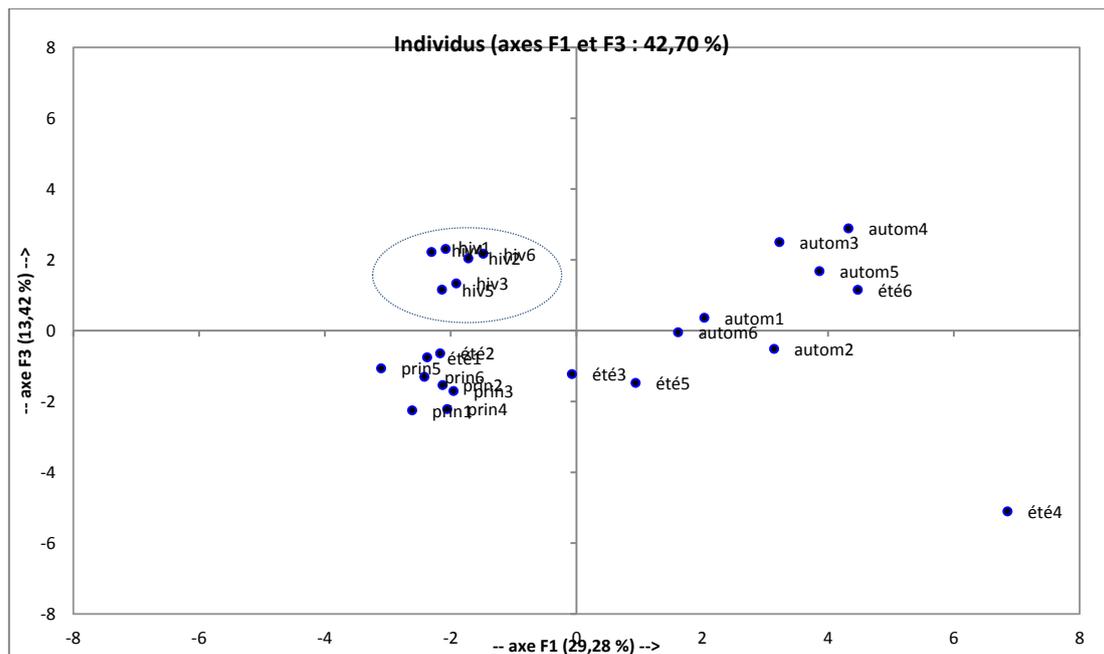


Figure. 62 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PC de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons

A. IV. 2. Variations saisonnières de la composition en acides gras des phosphatidyléthanamines (PE) de la chair de *P.radiata*.

A.IV.2. a. Analyse des résultats

La phosphatidyléthanamine (PE) figure parmi les principaux phospholipides des tissus animaux suite au PC.

Les variations saisonnières des acides gras des PE sont présentées dans l'annexe (3). Les valeurs les plus faibles d'AGPI ont été enregistrées au printemps-automne (1,27-0,62mg/100g des acides gras totaux) et la plus élevée en hiver (maximum en février 22,25mg/100g des acides gras totaux) ($p < 0,05$). Le pourcentage des AGS allait de 5,64 en hiver et 0,69 mg/100g en été.

A.IV.2. b. L'analyse en composante principale (ACP)

Pour cette ACP, de la variation de la composition en acides gras des PE chez *pinctada radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons nous avons utilisé les différents acides gras comme descripteurs, leurs représentations sur un plan F1 x F2 absorbent 49,87% de la variance totale (Fig.63, Tab XI).

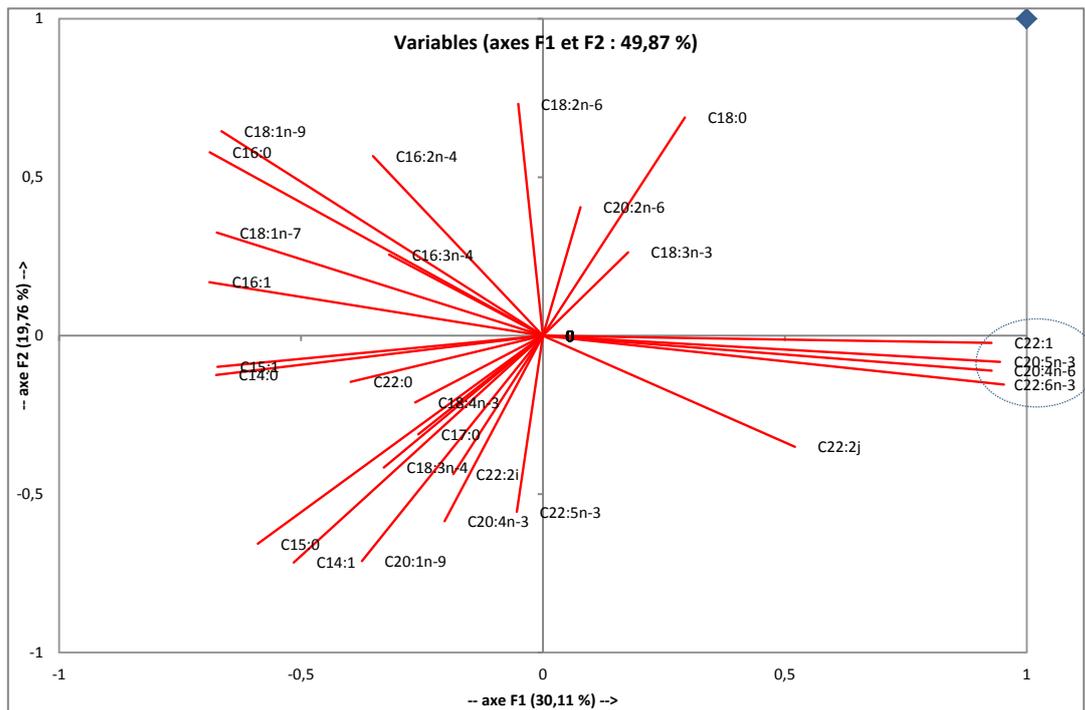
L'axe F1, absorbant 30,11% de la variance, sélectionne négativement le groupe des acides gras essentiels distingués essentiellement par EPA, DHA et ARA ainsi que C22 :1 et positivement selon le plan factoriel (1x3) (Fig.64, Tab XI). Quant à l'axe F2, absorbant 19,76% de la variabilité, sélectionne négativement les acides gras saturés.

A partir de cette association, nous pouvons déduire une forte corrélation positive sur la projection des individus que ce soit sur le plan F1 x F2 et F1 x F3 ; le plan F3 absorbant 10,26% de la variabilité. L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 90,24% de la variance totale.

Tableau XI. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (PE).

Chair (PE)	F1	F2	F3
Valeur propre	8,12	5,33	2,77
Cumuls de la variance expliquée (%)	30,10	49,86	60,12

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

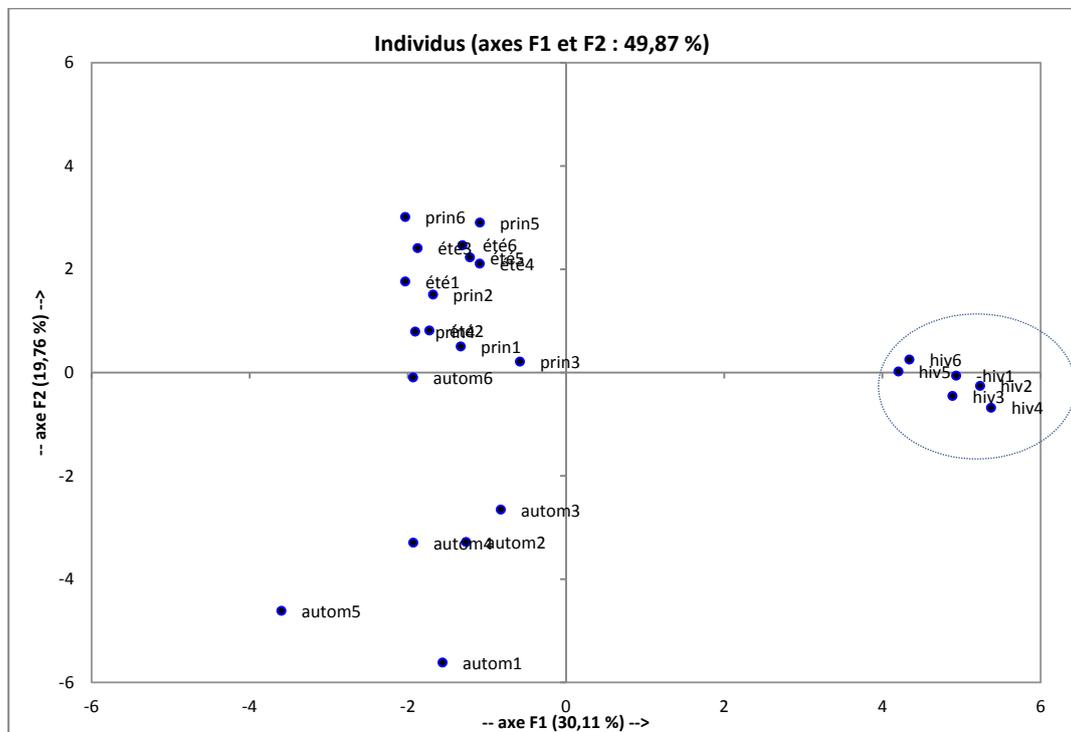
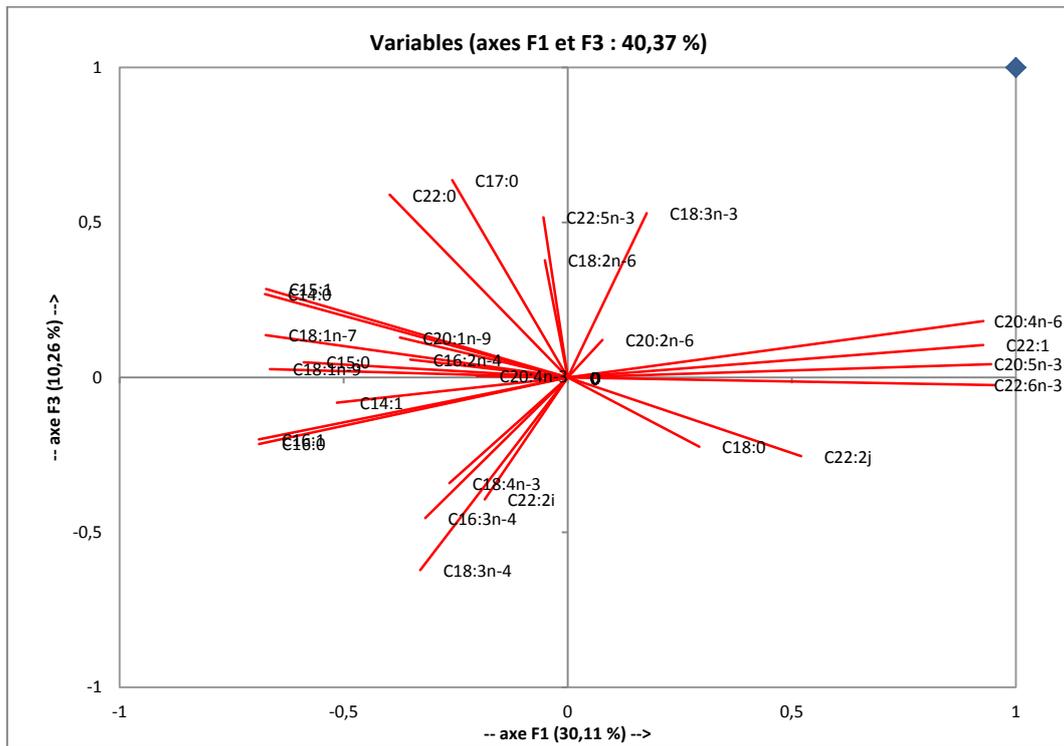


Figure. 63 Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PE de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

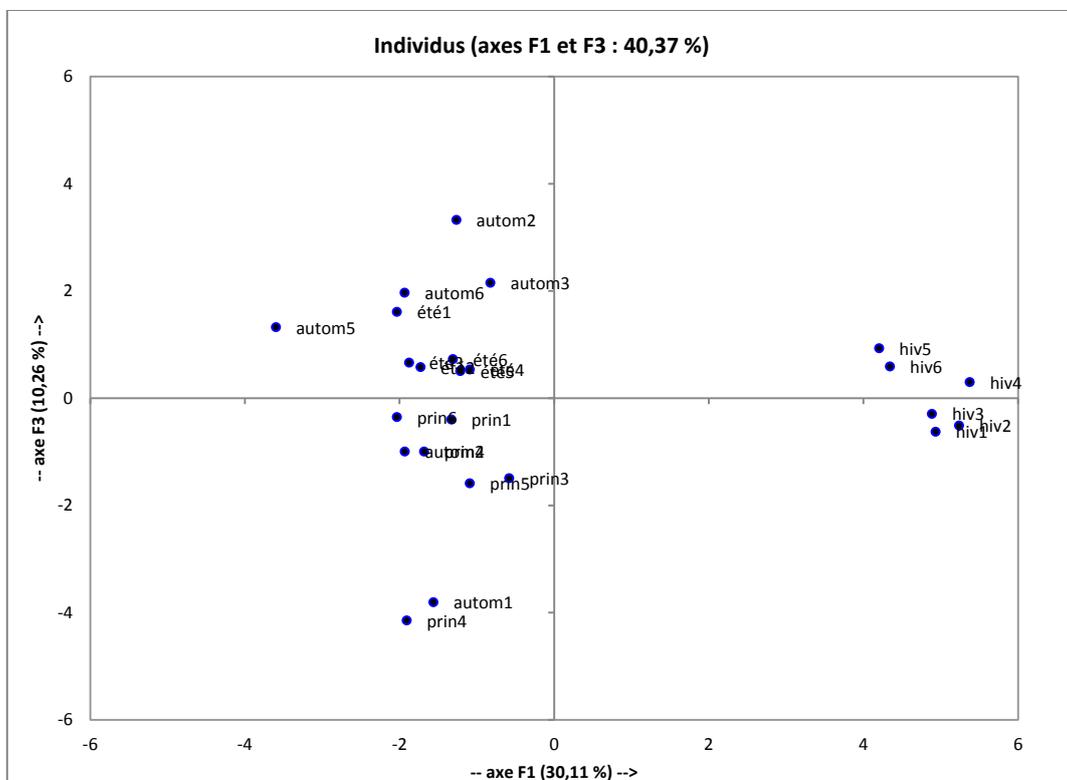


Figure. 64 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PE de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

A.IV. 3. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PI de la chair de *P.radiata*.

Les résultats de l'ACP de la variation de la composition en acides gras des PI chez *P.radiata* en fonction des saisons (fig.65, tab XII) nous ont permis de retenir les deux premiers axes qui contribuent ensemble par 51,84% à la variance totale. Le premier axe contribue à lui seul par 34,27 % alors que le deuxième ne contribue que par 17,57 %.

Cette représentation montre que l'axe F1 est clairement lié aux acides gras suivants : C16 :0, C22 :0, C22 :1, C20:2n-6, C18 :1n-9, C20 :5n-3 ainsi que C18 :0, C18 :1n-9, C20 :4n-6 et C22 :6n-3, alors que l'axe F2 est plutôt lié aux acides gras saturés C15 :0, C17 :0 et monoinsaturés C15 :1, C20 :1n-9 également C22 :5n-3, C18 :2n-6.

Cette analyse nous a permis de différencier 2 groupes (G1 et G2). Le groupe G1 associe la majorité des acides gras saturés et l'EPA qui coïncide avec l'élévation des pourcentages de ces derniers durant la saison hivernale selon la projection des individus sur le plan factoriel (1 ×2).

Le groupe G2 présente la majorité des acides gras monoinsaturés qui coïncide avec la saison d'automne selon la projection des individus sur le plan factoriel (1 ×2) par contre l'axe factoriel 2 sélectionne négativement l'ARA et le DHA qui coïncident avec les saisons de printemps et de l'été.

Tableau XII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (PI).

Chair (PI)	F1	F2	F3
Valeur propre	9,25	4,74	3,80
Cumuls de la variance expliquée (%)	34,27	51,84	65,93

A.IV. 4. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PS de la chair de *P.radiata*.

L'ACP de la variation de la composition en acides gras des PS chez *pinctada radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons utilisant les différents acides gras comme descripteurs, leurs représentations sur un plan F1 x F2 absorbent 49,52% de la variance totale (Fig.66, Tab XIII).

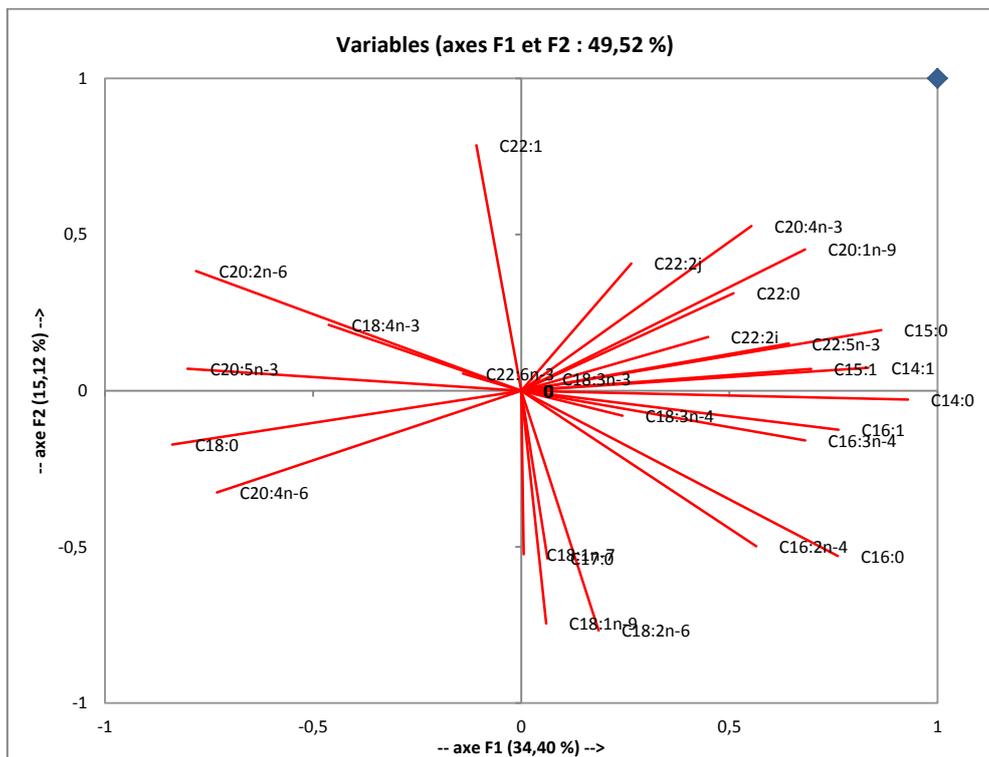
L'axe F1, absorbant 34,40% de la variance, sélectionne négativement ARA qui coïncide avec la saison printanière selon la projection des individus selon le plan factoriel (1×2) l'axe F3 sélectionne négativement l'EPA et l'ARA selon le plan factoriel (1×3) qui coïncide avec les deux saisons hivernale et printanière selon la projection des individus (Fig.67, Tab XIII).

A partir de cette association, nous pouvons déduire une forte corrélation positive sur la projection des individus que ce soit sur le plan F1 x F2 et F1 x F3 le plan F3 absorbant 9,73% de la variabilité. L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 93,64% de la variance totale.

Tableau XIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (PS).

Chair (PS)	F1	F2	F3
Valeur propre	9,28	4,08	2,62
Cumuls de la variance expliquée (%)	34,39	49,51	59,24

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2)



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

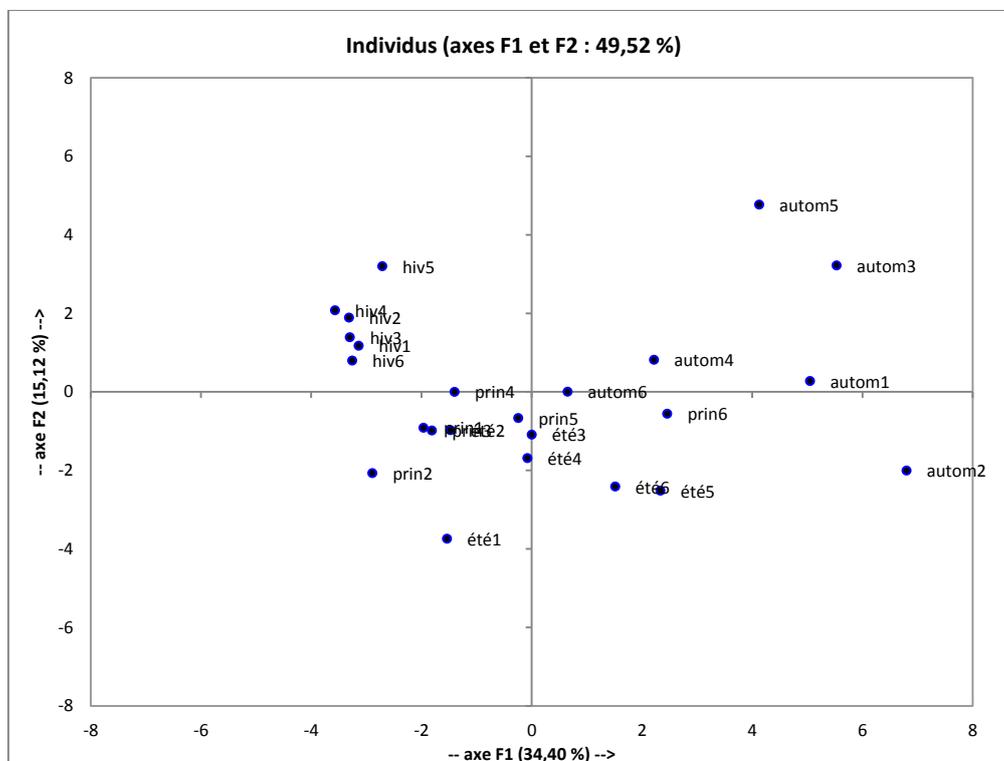
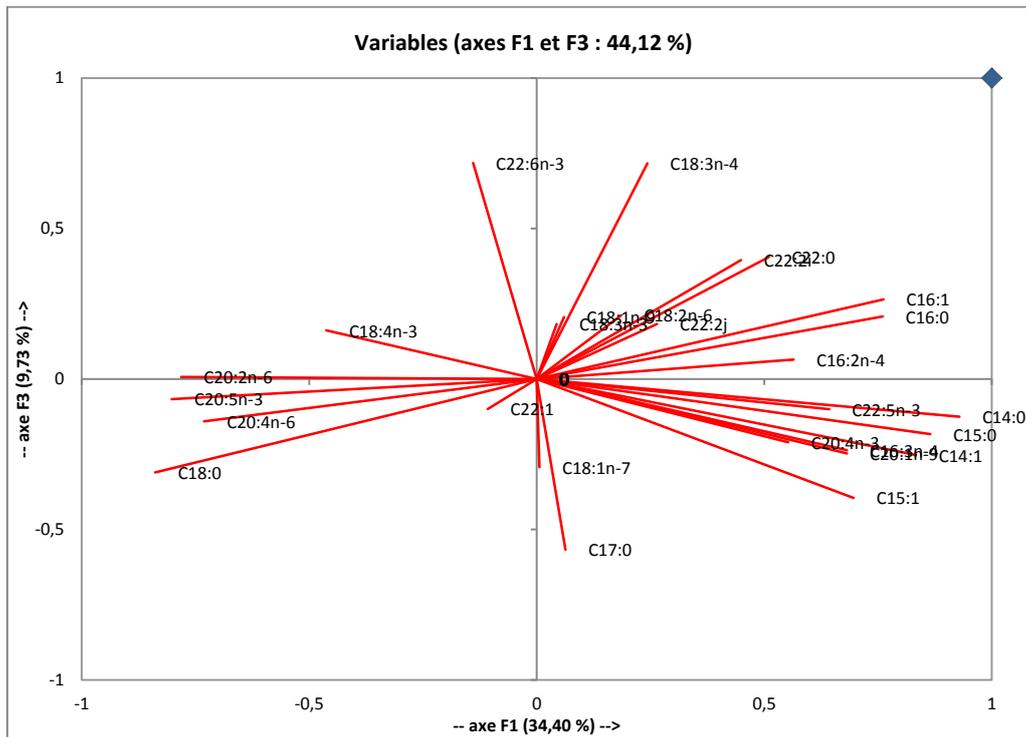


Figure. 66 Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des PS de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

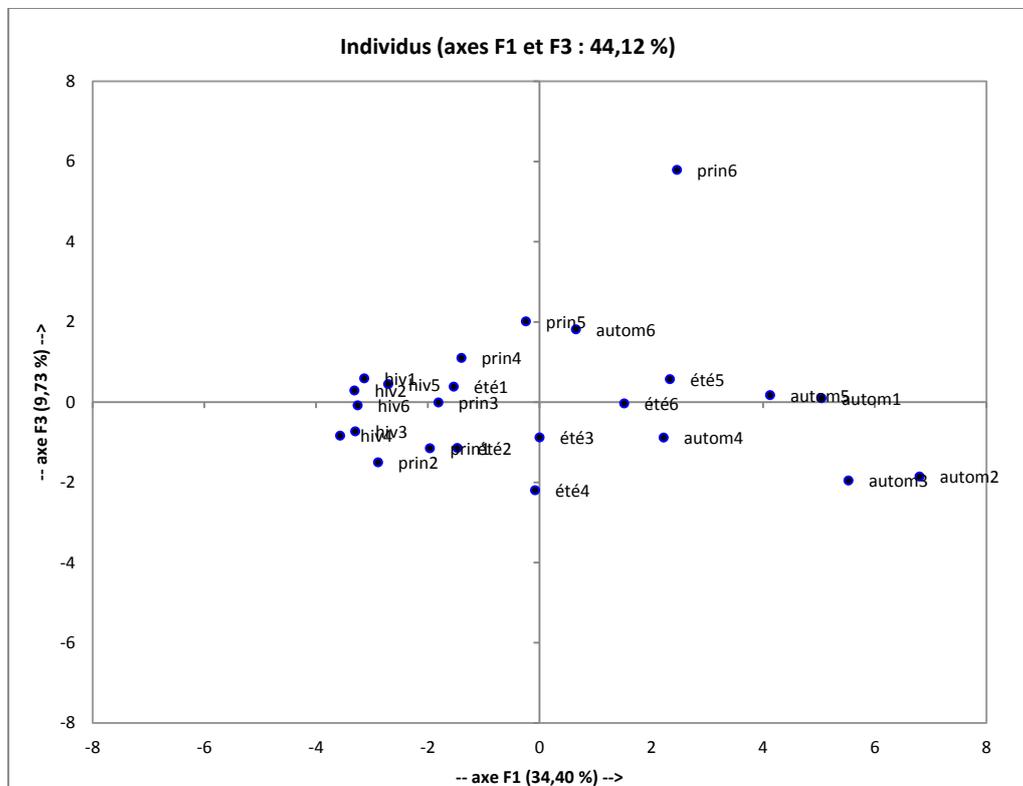


Figure. 67 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PS de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

B. Discussion

B.I. Variation saisonnière de la teneur en eau de la chair de *Pinctada radiata*

L'huître perlière *Pinctada radiata*, étant un mollusque bivalve, est une espèce exotique d'origine Indo-pacifique. Elle abonde dans les mers tempérées, tropicales et subtropicales, en raison de son caractère thermophile.

Pinctada radiata est répandue dans la Méditerranée orientale, la Mer Rouge et l'Océan Indopacifique incluant l'Inde, la Chine, le Taiwan, la Corée, le Japon et l'Australie. Elles abondent également le golfe Arabe (Yu & Chu, 2006a et 2006b).

Les résultats de la variation saisonnière de la teneur en eau montrent clairement que la période où l'on trouve la plus haute valeur coïncide avec la valeur élevée de température automnale. Assurément, *P. radiata* fait partie des animaux poïkilothermes. Ce caractère explique la variation de la teneur en eau en fonction de la saison. En effet, pour faire face aux changements climatiques externes, l'absorption de l'eau par *P. radiata* suit un débit modéré pour garder des conditions physiologiques internes stables. *P. radiata* se trouve dans l'étage infralittoral, appelé aussi zone infratidale. Cette partie du littoral est constamment immergée et la frange supérieure peut cependant être émergée aux marées basses de vives eaux les plus grandes. Sa limite inférieure est celle qui est compatible avec la vie des algues photophiles et des phanérogames marines (entre -10 et -40 m en fonction notamment de la turbidité). C'est l'étage caractérisé par la présence des laminaires (algues brunes) et celle des algues rouges.

Par conséquent *P. radiata* a tendance à absorber beaucoup d'eau toute l'année. Certains animaux ectothermes sédentaires (moules et huitres par exemple) ont développé des moyens de se protéger contre la déshydratation et de nombreux prédateurs (Huey & Kingsolver, 1989).

B.II. Variation saisonnière du taux en protéines de la chair de *Pinctada radiata*

Dans le présent travail et dans le contexte de la mise en évidence de la composition biochimique de la chair, un lot de pintadine de la région de Maharès a permis particulièrement

l'étude de la composition en acides gras et en lipides en fonction des saisons et en protéines totales durant la période d'étude considérée.

La composition en protéines varie en fonction des cycles saisonniers de stockage de réserve énergétique (glycogène, protéines et lipides) et de la reproduction (Ahn *et al.*, 2000 ; Ojea *et al.*, 2004). Les variations des teneurs en protéines ne sont pas significatives. Il est possible donc de consommer cette espèce durant toute l'année et bénéficier du taux de protéines qui concorde avec celui trouvé chez d'autres huîtres : 9,5g selon Coast Seafoods Company (2011). La teneur en protéines diminue en hiver et s'élève en été. Ces résultats concorde avec celui trouvé chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* qui révèle une différence significative entre l'été austral (0,035 mg/l) et l'hiver austral (0,025mg/l), à comparer avec le milieu polynésien oligotrophe à capacité biotique peu importante à Tokapoto (Buestel *et al.*, 2001).

En effet, la teneur la plus élevée en protéines totales correspond à la saison d'automne et plus particulièrement au mois de novembre, considérée comme la période de repos sexuel. Ce taux diminue légèrement en hiver au mois de février, mois pendant lequel la gamétogénèse est entamée et nous avons une multiplication active des gonies (Zouari, 1994), ce qui indique une demande énergétique importante au cours de cette période ou une intense activité gamétogénique avec présence du stade d'émission gamétique.

Ce résultat montre l'implication de la chair de *P. radiata* dans le stockage des protéines témoignant d'un apport nutritionnel suffisant permettant l'accumulation de ce métabolite.

Ces résultats concordent avec ceux enregistrés chez les pectinidés par Barber & Blake (1981) Il en est de même pour *Chlamys islandica* et *Euvola ziczac* (Brokordt, 2000).

En effet, chez les bivalves matures, les protéines somatiques ont été identifiées comme une source majeure d'énergie lors de la maturation gonadique par divers auteurs (Mann & Glomb, 1978 ; Adachi, 1979 ; Barber & Blake, 1981). Elles sont également mobilisées durant les périodes d'approvisionnement alimentaire limité (Gabbott & Bayne, 1973 ; Beninger & Lucas, 1984). En effet, chez les bivalves, la mobilisation des protéines survient après l'épuisement des réserves de glycogène comme c'est le cas de *Donax vittatus* (Ansell & Sivada, 1973) et *Mytilus edulis* (Epp *et al.*, 1988).

Sur le plan bioénergétique, les protéines sont les principales sources de calories par rapport aux autres métabolites (carbohydrates et lipides). Ceci a été démontré par Lane (1986) chez le bivalve *Rangia cuneata* maintenu à jeun. Sur le plan physiologique, les protéines jouent un rôle de substrat respiratoire en cas de privation alimentaire chez les bivalves (Ansell & Sivada, 1973). Un effet bénéfique biologique est possible comme celui trouvé chez d'autres bivalves. Les moules qui contiennent une grande partie du tissu musculaire avec une teneur considérablement haute en protéines. En général, les peptides bioactifs dérivés des moules marines contiennent 5-40 résidus d'acides aminés. En fonction de la séquence d'acides aminés et les propriétés structurelles, les principaux effets biologiques des peptides de moules comprennent des activités antimicrobienne, anti-hypertenseur, et anticoagulantes (Je *et al.*, 2005 ; Jung & Kim, 2009; Löfgren, 2008 et Ulrike *et al.*, 2014).

B.III. Variation saisonnière des lipides totaux et des glycérophospholipides de la chair de *Pinctada radiata*

Les changements saisonniers dans le stockage et le déploiement de l'énergie en relation avec la gamétogénèse ont été bien étudiés durant ces trois dernières décennies, mais uniquement pour certaines espèces de bivalves d'intérêt commercial comme les coquilles Saint Jacques, les moules et les huîtres (Almaida *et al.*, 1999 ; Ansell, 1974 ; Barber et Blake, 1981; Bayne, 1976 ; Comely, 1974 ; Epp *et al.*, 1988 ; Gabott, 1975 ; Giese, 1969 ; Martinez, 1991 ; Saout, 1999 ; Taylor et Venn, 1979). Concernant les huîtres perlières, l'unique travail associant les cycles sexuel et biochimique a été effectué sur l'espèce *Pinctada mazatlanica* de Bahia de la Paz (Sacedo *et al.*, 2002).

Au niveau des côtes tunisiennes, l'étude du profil lipidique chez les organismes aquatiques a fait l'objet de nombreuses publications. Les apports exogènes en éléments nutritifs constituent les principaux facteurs reflétant les caractéristiques biochimiques des organismes marins (Ackman *et al.*, 1995). Le profil, la qualité et la quantité en lipides diffèrent suivant les paramètres physicochimiques du milieu et la richesse de l'environnement marin en nutriments (Rosa *et al.*, 2004 ; Ezzeddine-Najaï *et al.*, 1997 ; Ozogal *et al.*, 2008).

La littérature concernant la composition lipidique de *P.radiata* est peu fournie dans le monde et n'existe pas pour la méditerranée.

Les résultats de la variation saisonnière des lipides totaux montrent que les teneurs en AGT variaient entre 79mg et 400mg/100g du poids frais (PF). Selon le tableau 4, les plus fortes teneurs ($p < 0,05$) ont été observées en hiver (400mg) et au printemps (334mg). Des teneurs plus faibles distinguaient l'été et l'automne.

La durée de vie d'un organisme marin est basée essentiellement sur la physiologie de la nutrition et la reproduction (Dave *et al.*, 1976). On peut suggérer que l'hiver correspond à une saison d'intense activité trophique se traduisant par une forte teneur en AGT, cette teneur serait mobilisée en vue de la maturation des œufs chez *Pinctada radiata*. On peut assumer que la période de ponte débiterait au printemps et se prolongerait à la fin de l'été. Ces résultats corroboreraient les observations de Tlig Zouari (1994) qui stipulaient que l'activité sexuelle des pintadines s'étalait tout au long de l'année avec une période de ponte qui avait lieu principalement pendant l'été.

Tableau XIV. Composition en acides gras totaux et phospholipides majeurs dans la chair de *Pinctada radiata*. (a,b,c) – valeurs dans les lignes ayant des indices de lettre différents de façon significative, $P \leq 0,05$.

	Hiver	Printemps	Eté	Automne
AGT	400,21±50,12 ^a	334,28±76,8 ^a	187,06±8,97 ^b	79,61±6,18 ^b
PC	69,71±18,24 ^a	52,45±14,56 ^a	6,97±1,18 ^b	27,69±3,52 ^{ab}
PE	32,74±8,57 ^a	5,04±1,49 ^b	1,68±0,32 ^b	15,91±3,03 ^b
PC/PE	2,08 ^b	12,06 ^a	4,55 ^b	2,17 ^b

Il est nécessaire d'établir la composition en acides gras des lipides de réserves et des PL pour estimer la valeur nutritive d'un organisme marin (Cengiz *et al.*, 2012). Les variations saisonnières de la composition en acides gras de *P.radiata* sont présentées dans l'annexe 1. Vingt huit acides gras ont été identifiés dans la chair de *P.radiata*. Les principaux acides gras observés en toutes saisons étaient l'acide palmitique (C16:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide palmitoléique (C16:1n-7), l'acide oléique (C18:1n-9), l'acide

eicosadiénoïque (C20:2n-6), AA (C20:4n-6), l'EPA (C20:5n-3), l'acide docosapentaénoïque (C22:5n-3, DPA) et le DHA (C22:6 n-3).

Les acides gras polyinsaturés les plus caractéristiques de *P.radiata* se sont révélés être de l'acide docosahexaénoïque (C22:6n-3) et de l'acide eicosa-pentaénoïque (C20:5n-3), qui se situaient respectivement entre 13,94 et 16,04 % et 4,18 et 5,78% des acides gras totaux.

L'acide arachidonique (C20:4 n-6), a été trouvé dans des proportions variant de 3,69 à 7,44% des acides gras totaux (Ben Ammar *et al.*, 2014). Daria *et al.*, (2012) ont également constaté que l'acide arachidonique est représenté par 5,10% des acides gras totaux dans *Mytilus galloprovincialis* du Mali Ston Bay et dans *Ostrea edulis* de la même région, il variait de 0,30 à 4,65% des acides gras totaux.

On a observé que la composition en acide gras de *P.radiata* variait tout au long des saisons. Sauf pour les acides myristique, stéarique, palmitoléique, eicosadiénoïque, EPA, DPA et DHA, eicosadiénoïque, des différences significatives saisonnières ($P < 0.05$) ont été observées parmi les autres acides gras. Nous avons enregistré également que les quantités de DHA et l'EPA ont été élevés en hiver, période pouvant être conçue pour la consommation de la chair de *P.radiata* pour les lipides totaux (16,5%) et les lipides polaires (29,72%) par rapport à ceux enregistrés par Saito (2004) de *P. fucata* (21,00% en lipides polaires) (Ben Ammar, 2014).

La chair de *P. radiata* est plus riche en DHA qu'en EPA. Ce résultat est différent de celui trouvé chez certains autres espèces de bivalve comme les moules, les huîtres, les coques et les clovisses (Murphy *et al.*, 2002 ; Ruano *et al.*, 2012) qui possèdent dans leurs tissus des quantités d'EPA plus élevées que celles de DHA. Quelque soit cette différence de richesse en acides gras des acides gras de la série (n-3), un équilibre sain entre le n-3 et n-6 PUFA par la consommation de fruits de mer est recommandé par les directives diététiques actuelles (Orban *et al.*, 2006).

Différents organismes internationaux de santé ayant établi des recommandations pour la prise des AGPI attribuent les bénéfices cardiovasculaires de ces AGPI essentiellement à l'EPA et au DHA. Par exemple, le groupe d'étude sur la nutrition britannique (1992) a montré que, pour une alimentation saine et équilibrée, nous devrions tous consommer 0,5 % d'EPA + DHA par jour qui est équivalent à 1,1 g. Cependant, l'ANC 2000 a recommandé la consommation de 0,12 g de DHA par jour. En même temps, comparant les bénéfices nutritionnels des oméga 3 des huîtres avec Coast Seafoods Company (2011), les Huîtres sont chargés avec des acides gras oméga 3 qui sont bons pour les articulations, la peau, la vision, le

cerveau, le cœur et aide à réduire le mauvais cholestérol (LDL). Ainsi servir en hiver 300g de la chair de *P. radiata* (environ 6 huîtres moyennes) pourrait apporter 600 mg d'oméga 3, sachant que la valeur moyenne quotidienne recommandée est de 1000 mg pour les femmes et 600 mg pour les hommes.

En tenant compte de la teneur relativement faible en lipides chez *P. radiata*, on peut supposer que les pourcentages élevés d'EPA et de DHA, en particulier dans leur fraction lipidique totale, reflètent l'association préférentielle de ces acides gras avec des phospholipides dans les membranes cellulaires, tel que rapporté par Orban *et al.* (2006) chez le bivalve *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758). Ces acides gras sont, en effet, impliqués dans la structure et la fonction des membranes cellulaires (Pazos *et al.*, 2003). D'autre part, les pourcentages des DHA et des EPA ont atteint leurs maximums en hiver et au printemps, ce qui coïncide avec la période de la gamétogenèse de l'espèce. Ce résultat est similaire à ceux trouvés dans d'autres mollusques bivalves comme les pétoncles, *St-Jacques*, *Chlamys varia*, *Pecten jacobaeus* (Katsanevakis; 2005) et des Pectinidés *Flexopecten glaber* (Telahigue *et al.*, 2010) sur les côtes tunisiennes du nord qui ont des valeurs nutritionnelles intéressantes en raison de leurs niveaux relativement élevés de acides gras polyinsaturés n -3, en particulier en EPA et DHA.

En fait, ces deux acides gras suivent de près l'évolution de la classe des AGPI à laquelle ils appartiennent. Des résultats similaires ont été également rapportés chez d'autres espèces de bivalves (Abad *et al.*, 1995 et Dridi *et al.*, 2007).

De plus, nous avons remarqué la présence des deux acides diénoïques (NMID) (C22:2i et C22:2j) (diénoïque de méthylène non-interrompue (NMID) (C22:2): C22:2i (de 0,4 to 1.59 mg/100g) et C22:2j (de 0,07 à 0.3mg/100g). Ces acides gras sont présents à des faibles proportions (Ben Ammar *et al.*, 2014). Le rôle de ces 22:2 NMID reste encore mal connu, cependant, l'association avec les lipides membranaires et la rétention sélective chez les animaux à jeun suggère une fonction structurale/métabolique et/ou une forte résistance contre la dégradation des membranes cellulaires (Klingensmith, 1982). Chez les mollusques, le système d'élongation et de désaturation des acides gras est généralement actif permettant ainsi la synthèse «de novo» des acides gras NMID.

D'après Abad *et al.* (1995) et Ojea *et al.* (2004) ces AG étaient les seuls AGPI synthétisés par les mollusques marins. Zhukova, (1991) a supposé que la biosynthèse de ces AG emprunte la

voie des AGMI de la série (n-7) jusqu'au C20:1n-7, qui sera désaturé par la $\Delta 5$ désaturase en C20:2n-5 et ensuite allongé à C22:2n-7 par une élongase.

Selon plusieurs auteurs, ces acides gras (C22:2i et C22:2j) sont impliqués dans les mécanismes de la fluidité, de l'intégrité et de la structure de la membrane (Gilles, 2009). La présence d'acides gras en C22:2i et C22:2j bivalve confère une protection contre des altérations de la membrane en raison de changements dans l'environnement physico-chimique. Gilles (2009) a rapporté la capacité des mollusques bivalves à synthétiser des acides gras polyinsaturés appelés C22 indéterminée: 2i et C22:2j.

Il est possible que face à une carence alimentaire en AG insaturés, essentiellement les AGPI (n-3) et (n-6), les mollusques synthétisent ces AG NMID nécessaires pour maintenir la fluidité de la membrane cellulaire (Abad *et al.*, 1995). En fait, Ojea *et al.* (2004) ont signalé que les C22:2i et C22:2j dans les lipides polaires de *R. decussatus* étaient négativement corrélés avec l'EPA, et que les C22:2j sont négativement corrélés avec les DHA.

Dans une autre étude, Klingensmith (1982) a mis en évidence une relation inverse entre AGPI (n-3), en particulier l'EPA et le DHA, et les AG NMID chez les palourdes *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). De même, dans le présent travail, l'augmentation de la C22:2j et C22:2i coïncide respectivement avec les faibles niveaux d'EPA et de DHA.

Hughes *et al.* (1996) ont démontré que les acides stéarique, palmitique et myristique (C14:0), voire l'acide laurique (C12:0), possèdent des métabolismes différents et qu'on ne doit plus les considérer en bloc. Nos résultats montrent que le C14:0 affiche les plus faibles pourcentages par rapport au groupe C16:0 - C18:0. Rioux *et al.* (2000) affirment que l'acide myristique est rapidement oxydé dans la cellule et en tous cas, il disparaît plus vite que l'acide palmitique dont il participe à son accumulation par élongation très active. Dans la cellule, le C14:0 assure la myristoylation des protéines (Rioux *et al.*, 2002) et permet entre autres leur insertion dans la membrane, conférant à cet acide le rôle d'ancre hydrophobe (Duronio *et al.*, 1992).

Tout comme les AGS, les AGI atteignaient leurs valeurs maximales en hiver et au printemps. Les teneurs en AGMI de lipides totaux variaient ($P < 0.05$) de 6.9 à 36 mg/100g PF. L'acide palmitoléique a été identifié comme le composé principal des AGMI en toutes saisons. Les niveaux de cet acide gras musculaire étaient 4,56% en été, 3,82% au printemps, 3,68% en automne et 3,59% en hiver. L'acide oléique est le second composé identifié avec un pourcentage de 4% au printemps. Les bactéries, en tant que l'un des éléments biotiques des

écosystèmes benthiques, sont considérées comme la principale source du C18:1n-9 issu de la désaturation du C18:0 et du C18:1n-7 produit par l'élongation du C16:1n-7 (Stubling & Hagen, 2003). Certains AGMI comme le C18:1n-9 est considéré comme un bio marqueur des dinoflagellés et des bactéries planctoniques alors que le C16:1n-7 caractérise les diatomées (Graeve *et al.*, 2008). Le C20:1n-9 qui varie significativement entre les saisons est un bio marqueur de *Calanus* (Svetlana *et al.*, 2013). Les AGPI totaux étaient plus élevés en hiver et au printemps. Les teneurs enregistrées étaient de 149 et 133mg/100g PF. Le DHA était le plus abondant des AGPI n-3, variant statistiquement ($P < 0,05$) de 16% (hiver) à 13,9% (automne). La proportion d'acides gras polyinsaturés n-6 variait de 38,67mg à 10,68mg/100g PF. L'acide arachidonique et de l'acide eicosadiénoïque ont été les principaux AGPI n-6.

Ainsi, le ratio AA/AL qui indique l'activité de la linoléoyl-CoA désaturase (Svetlana *et al.*, 2013), était plus élevé en automne (Annexe 1) témoignant un taux important de l'AA pendant cette saison. Parmi les diatomées, certains organismes comme les Bacillariophyceae se distinguent par leurs richesses en EPA (Nichols *et al.*, 1993) et en AA (Ackman *et al.*, 1968).

On peut suggérer que durant les autres saisons, les diatomées constitueraient les réservoirs en EPA et AA pour *P.radiata*. Les pourcentages en DHA ne varient pas significativement entre les saisons. Certains organismes phytoplanctoniques contiennent des quantités notables de DHA et particulièrement les dinoflagellés (Saito *et al.*, 2004).

Les valeurs du ratio AGPI/AGS variaient entre 0,70 (hiver) et 0,91 (automne) alors que valeur minimale de rapport AGPI / AGS recommandée est 0,45 (HMSO, 1994). Le ratio n-3/n-6 est meilleur que le rapport AGPI / AGS pour comparer la qualité de la graisse pour différentes espèces, car il considère les familles d'acides gras de type n-3 et n-6 séparément (Sargent *et al.*, 1995). Ces valeurs variaient entre 2,13 et 3,12.

Notre étude a révélé que *P.radiata* est une espèce de mollusques ayant une valeur nutritionnelle élevée pour la consommation humaine en raison de son fort ratio n-3/n-6 (Ben Ammar *et al.*, 2014).

L'importance des lipides dans l'adaptation des huîtres à un environnement changeant est indiquée par les valeurs optimales des ratios acides gras. Le ratio AGS / AGI joue un rôle important dans la détermination de diverses propriétés de membranes biologiques, telles que la fluidité membranaire, qui aident à maintenir un métabolisme normal des cellules (Murzina *et al.*, 2013). Dans ce travail, les ratios C16:0 / C18:1n-9 étaient de 50 en hiver, 7,13 au printemps, 19,9 en été et 8,32 en automne. Kal'chenko *et al.* (2004) ont affirmé que ces

ratios reflétaient le niveau d'activité du métabolisme lipidique des organismes marins. Selon les mêmes auteurs, ces ratios dépendaient principalement du contenu en acides gras de la nourriture et de la capacité de l'organisme à modifier ses acides gras en réponse à des conditions externes et internes.

Les lipides polaires sont les constituants majeurs des membranes cellulaires, leur teneur et leur composition sont relativement constantes (Médale, 2009). Plusieurs autres auteurs ont observé que les changements saisonniers de la part relative des lipides totaux de certaines espèces de bivalves sont principalement causés par les fluctuations des triacylglycérols TAG tandis que les phospholipides (LP) sont maintenus relativement constant (Trider et Castell, 1980 ; Pazos *et al.*, 1996, 1997a). Ils sont constitués principalement de PC (50 à 60 % des PL) et de PE (20 à 30 % des PL) (Aursand *et al.*, 1994). Dans ce travail, la PC et la PE affichent des pourcentages relatifs (PC+PE) de 68% et 32%.

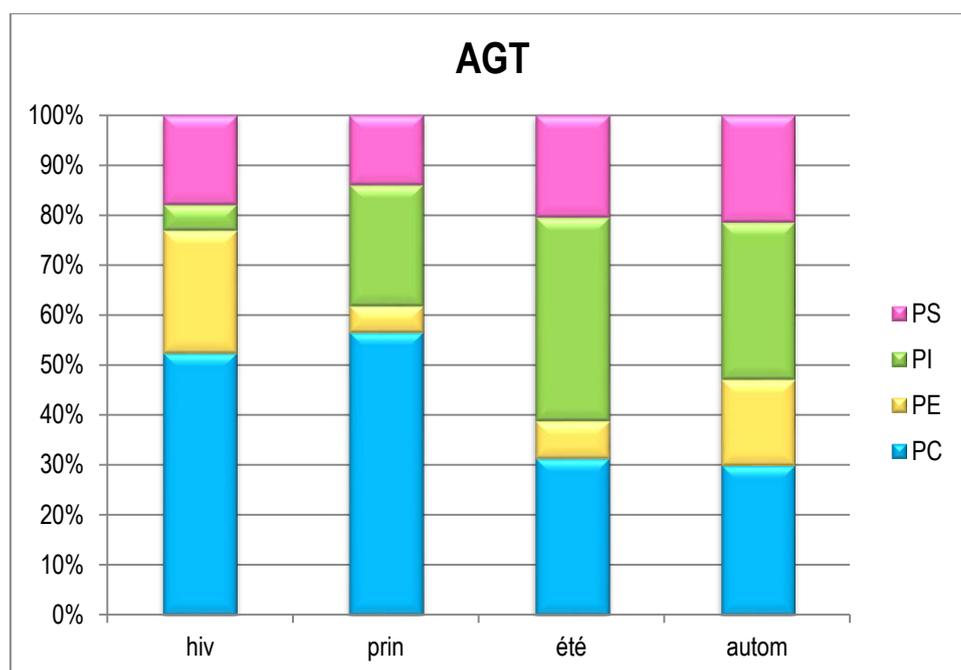


Figure 68 .Variations des teneurs (%) des acides gras totaux des différentes catégories lipidiques de la chair de *P. radiata* en fonction des saisons

PC : Phosphatidylcholines ; PS : Phosphatidylsérine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; PI : Phosphatidylinositol.

Les saisons estivale et automnale sont caractérisées respectivement par les pourcentages les plus élevés en PI et en PS. (Fig.68). La classe des PE, par contre, atteint ses pourcentages les plus élevés en automne et hiver

Comme nous l'avons déjà mentionné, les PE et le PC sont majoritaires par rapport aux autres glycérophospholipides (PI et PS). Ceci est également vrai pour plusieurs autres bivalves marins. Le suivi saisonnier de l'évolution des glycérophospholipides montre des variations significatives ($p < 0,05$) des pourcentages de PC, PE et PI. Par contre, ceux de PS varient peu au cours du temps. Ces variations très mineures seraient dues au fait que les phospholipides, desservent principalement les fonctions de type structural (Swift, 1977 ; Pazos *et al.*, 1997a).

D'après la figure 68 le taux de PI est élevé en été ce qui coïncide avec les résultats de l'analyse en composante principale. Cette analyse nous a permis de différencier 2 groupes (G1 et G2). Le groupe G1 associe la majorité des acides gras saturés et l'EPA qui coïncide avec l'élévation des pourcentages de ces derniers durant la saison hivernale. Le groupe G2 présente la majorité des acides gras monoinsaturés qui coïncide avec la saison d'automne et présente l'ARA et le DHA qui coïncident avec les saisons de printemps et été.

Les changements dynamiques dans la composition et le métabolisme des phospholipides dans les membranes biologiques sont des réponses à des facteurs environnementaux, en particulier la température (Hazel et Williams, 1990; Hochachka & Mommsen, 1995). Les plus fortes teneurs en PC ont été observées en hiver (69mg) et au printemps (52mg) alors que la plus faible (6,9) a été enregistrée en été ($p < 0,05$). Une concentration de 32mg a été notée pour la PE en hiver contre 1.68mg en été ($p < 0,05$).

Il est connu que le rapport PC / PE (Tab.XIV) d'un organisme diminue au cours de l'adaptation thermique (Svetlana *et al.*, 2013). Ce rapport affiche une faible valeur en hiver (2,08) ce qui coïncide avec l'augmentation de la teneur en PE. Les compositions en acides gras des catégories phospholipidiques (PC et PE) de *P. radiata* récoltée durant les quatre saisons sont consignées dans les annexes 2 et 3.

Six acides gras majeurs avec des variations significatives ($p < 0,05$) ont été identifiés au sein de la PC durant les quatre saisons (Annexe 2). Parmi les AGS, on a retenu le C16:0 (27,5-39,29%) et le C18 :0 (5,97-7,98%). Le C16:1n-7 (1,75-7,88%) prédomine parmi les AGMI. Le C20 :4n-6 (3.21-4.37%) est le représentant principal des AGPI n-6. Il en est de même pour EPA (2,75-6,98%) et le DHA (10, 45-22,93%) parmi les AGPI n-3. En plus des six acides

gras majeurs identifiés au niveau de la PC, on a déterminé deux autres acides gras majeurs chez la PE à savoir le C14:0 (1,45-10,98%) et le C22:1n-9 (1,17-8,72%) (Annexe 3).

Les phospholipides (PC et PE) contiennent un pourcentage élevé d'AGPI. Les bivalves sont incapables de biosynthétiser des AGPI comme les acides arachidonique, EPA et le DHA, ils accumulent ces acides gras dans leurs tissus (Cook, 1991).

En hiver, nous avons observé une augmentation en insaturation des acides gras constitutifs de la PE. Cette augmentation se traduit d'une part, par la valeur de 6,8 du ratio AA/AL et d'autre part, par les pourcentages respectifs (Annexe 3) de l'EPA et du DHA qui sont de 12,37% et 33,63% (des AGT). Nous avons enregistré également un pourcentage de 8,72% pour le C22:1n-9 au sein de la PE. En conséquence, ceci permet de maintenir l'intégrité des biomembranes ainsi que les conditions optimales pour l'activité des enzymes membranaires connectées (Hochachka *et al.*, 2002).

L'insaturation des acides gras constitutifs de la PE est accompagnée par une élongation avec une valeur du ratio C_{16:0}/C_{18:0} de 0,40. Cette valeur est expliquée par une augmentation du pourcentage du C18:0 qui atteint 10,36%.

Pendant la saison de ponte, les pourcentages en AGPI varient significativement entre 2,73-18,6% au niveau de la PC et entre 0,62-1,27% au niveau de la PE. Pendant cette même saison, EPA et le DHA constitutifs de la PC et de la PE présentent des fluctuations importantes probablement à cause de la maturation des œufs qui exige des quantités importantes en EPA et en DHA (Fig. 69).

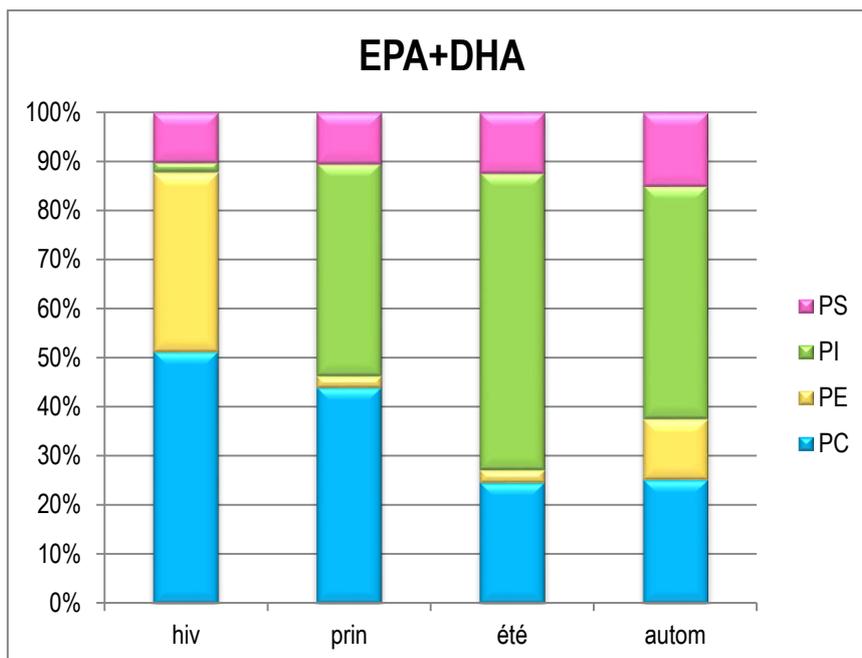


Figure 69 .Variations des teneurs (%) des EPA+DHA des différentes catégories lipidiques de la chair de *P. radiata* en fonction des saisons

PC: Phosphatidylcholines ; PS: Phosphatidylsérines ; PE: Phosphatidyléthanolamines ; PI: Phosphatidylinositols.

L'analyse en composante principale de la variation des pourcentages des PS suivant l'axe F3 présente l'EPA et l'ARA qui coïncide avec les deux saisons hivernale et printanière selon la projection des individus.

La répartition des AGPI des PL ou des TAG est un critère de choix pour la sélection des sources potentielles de PL. D'après Cansell *et al.* (2003), la biodisponibilité des AGPI n-3 est accrue lorsque le vecteur alimentaire est constitué par des PL plutôt que par des TAG. Les sources idéales qui pourraient être utilisées dans l'alimentation humaine doivent comporter des AGPI n-3 (ALA, EPA, DHA) et des AGPI n-6 (AL, ARA). Ces AGPI doivent être portés préférentiellement par les PL qui sont plus facilement assimilés par l'organisme que par les TAG (Parmentier *et al.*, 2007). Dans ce travail, nos résultats confirment que la PE est riche en acide arachidonique (8%), EPA (12,37%) et en DHA (33,63%). Il en est de même pour les PC avec des pourcentages respectifs de 4,17%, 6,98% et 22,93% des AGT (Ben Ammar *et al.*, 2014).

Les PE fournissent les PC (produit final) qui sont maintenus constants durant toute la période de suivi. Les PS et les PI sont fournis mais avec des quantités faibles par rapport aux deux autres glycérophospholipides. En effet, les PE avec les PS constituent les aminophospholipides principalement localisés dans la couche interne de la membrane cellulaire et sont particulièrement impliqués dans la fluidité des membranes et l'activité des protéines membranaires liées (Kraffe *et al.*, 2004 ; Delaporte *et al.*, 2005).

Gabbot, (1975) et Tocher et Sargent, (1984) ont également conclu que les phospholipides jouent principalement un rôle structural dans les membranes biologiques, mais peuvent aussi être stockées en grandes quantités comme une réserve de lipides dans les œufs des organismes marins.

Il est important de connaître la composition lipidique d'une huître en général et celle en phospholipides en particulier pour adapter les recommandations nutritionnelles aux besoins des patients et des consommateurs. La singularité de la lécithine ou PC c'est qu'elle ne s'accumule pas dans l'organisme à la différence des TAG et du cholestérol dont on connaît les pathologies de leur accumulation (Chanussot, 2008). Cependant, Il n'existe pas de données de consommation de lécithine puisqu'il n'existe pas de table française et européenne de composition des aliments en phospholipides (Chanussot, 2008). Les experts américains ciblant la choline, ont avancé que la dose adéquate de lécithine est de 6g/jour et celle de la choline est de 550mg/jour chez l'homme adulte (550 mg de choline / 70 kg de poids corporel / jour, 425mg chez la femme et un peu moins chez l'enfant (Zeisel *et al.*, 2003).

Chapitre II

Qualité et composition biochimique de la nacre de *Pinctada radiata* au niveau de la région de Maharès

A. Introduction

La nacre est depuis plusieurs décennies la texture coquillière la plus étudiée pour de nombreuses raisons : son intérêt économique, son utilisation potentielle en chirurgie réparatrice osseuse ou encore à cause de ses propriétés mécaniques remarquables. Elle est considérée comme modèle de référence, sans doute à cause de son apparente simplicité structurale. Elle sert de modèle pour l'élaboration de matériaux biomimétiques. Elle est présente au sein de quatre des huit sous-classes de mollusques, à savoir les bivalves, les gastéropodes, les céphalopodes et les monoplacophores.

Afin de mieux valoriser cette ressource en Tunisie et la proposer en orthopédie, nous avons entamé une analyse de ses constituants chimiques et biochimiques. Notre travail, préliminaire, constitue une étape primordiale à tout programme d'utilisation de cette espèce en orthopédie.

Ce chapitre présente l'étude de la qualité et de la composition biochimique de la nacre de *Pinctada radiata* au niveau de la région de Maharès et insiste plus particulièrement sur la variation de la composition en acides gras de la nacre, ses acides gras totaux, sa composition en acides gras de ses catégories lipidiques particulièrement ses glycérophospholipides (PE, PI, PS et PC) puisqu'ils constituent la composition majeure de la membrane cellulaire qui entrent dans les échanges cellulaires (Fig.70), en vue de préciser la composition et d'étudier leur rôle dans l'ostéogénie et qui fait l'objet du dernier chapitre.

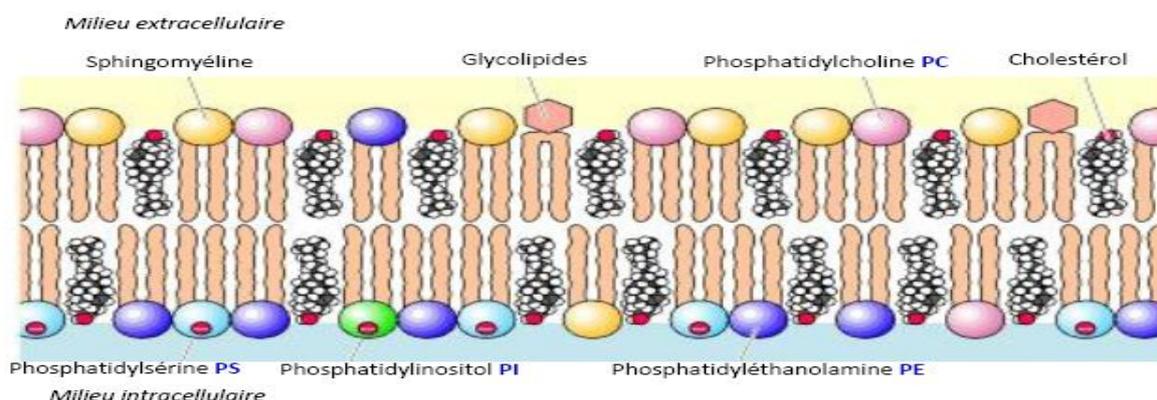


Figure 70. Schéma montrant la disposition des différentes composantes lipidiques dans la membrane (Cooper, 2000).

B. Qualité et composition biochimique de la nacre de *Pinctada radiata* au niveau de la région de Maharès

B.I. Variations saisonnières de la teneur en protéines totales de la nacre de *Pinctada radiata*

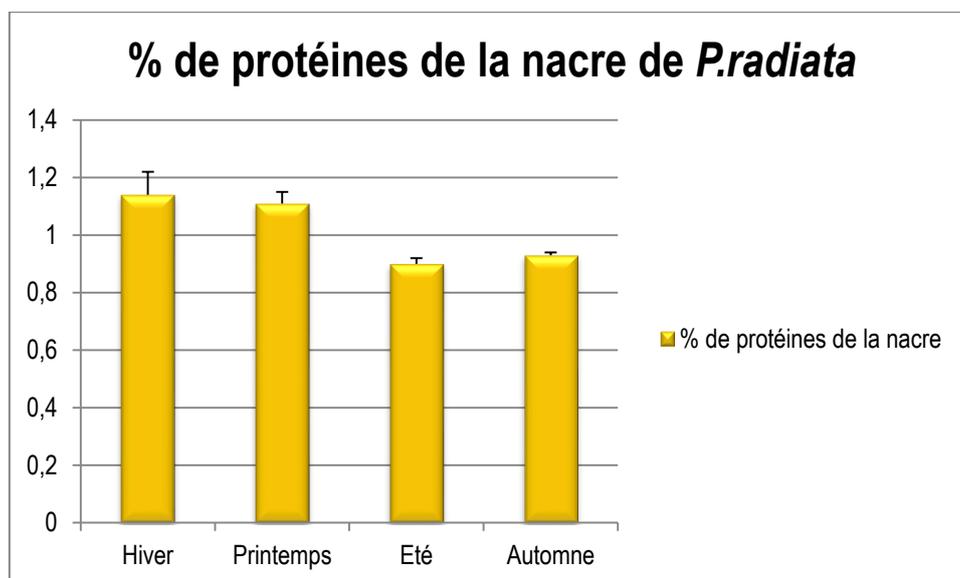


Figure.71 Variations des pourcentages moyens des lipides totaux de la nacre de *P. radiata* en fonction des saisons.

Les variations saisonnières des taux des protéines totales (exprimées en % correspondant à la masse en g/100g de poudre de nacre) dans la nacre de *P. radiata* au niveau de la station de Maharès sont représentés dans la figure (71). Le taux de protéines diffère d'une saison à une autre nous enregistrons (1,14 ± 0,08%) en hiver, (1,11 ± 0,04) en printemps, (0,9 ± 0,02%) en été et (0,93 ± 0,01%) en automne. Le taux de protéine en hiver et au printemps ne présente pas une différence majeure ($P < 0.001$) de ceux enregistrés en été et en automne. La valeur la plus élevée a été signalée en hiver (1,14 ± 0,08%). Les niveaux de protéines sont presque stables et ne varient pas beaucoup au cours des saisons.

B.II.Qualité de la nacre de *Pinctada radiata*

Cette partie présente l'étude sur la structure démographique et l'étude comparative morphologique et biométrique de *P.radiata* du littoral Tunisien.

Les stations d'études ont été fixées après une étude bibliographique relative à la répartition de l'huître perlière *P. radiata* sur les côtes de Tunisie et en se basant sur les prospections effectuées par le Laboratoire des Ressources Marines de l'INSTM, en tenant compte de l'accessibilité à ces sites. Afin d'effectuer une étude aussi complète que possible sur la population de l'huître perlière *Pinctada radiata* en Tunisie, 27 stations ont été prospectées. Seules 10 stations ont été retenues pour l'étude comparative (Bellaaj *et al.*, 2011).

En effet, La Marsa (L) est la seule station retenue sur le littoral nord. Sur le littoral Est, nous avons choisi deux stations portuaires, le port de plaisance Hammamet sud (H) et le port Stah Jaber de Monastir (Mo). Les stations d'études qui se localisent au niveau de la région du golfe de Gabès sont Sfax (Sf), Kerkennah (K), Maharès (Ma), Skhira (Sk), Zarzis (Z), Djerba (D) et Ajim (A).

B.II.1.Structure démographique de l'huître perlière *Pinctada radiata*

Nous nous sommes intéressés dans cette partie à l'étude des fréquences de taille de l'huître perlière *Pinctada radiata* dans les dix stations du littoral tunisien.

La taille moyenne des individus récoltés à Maharès est égale à 69,87 mm. Elle oscille entre un minimum de 19,92 mm et un maximum de l'ordre de 85,28 mm avec un écart-type égal à 12,01. Les Pintadines peuplant cette localité, ont souvent une taille supérieure à 60 mm. Les individus de cette taille représentent 92,31% du peuplement (Fig. 72).

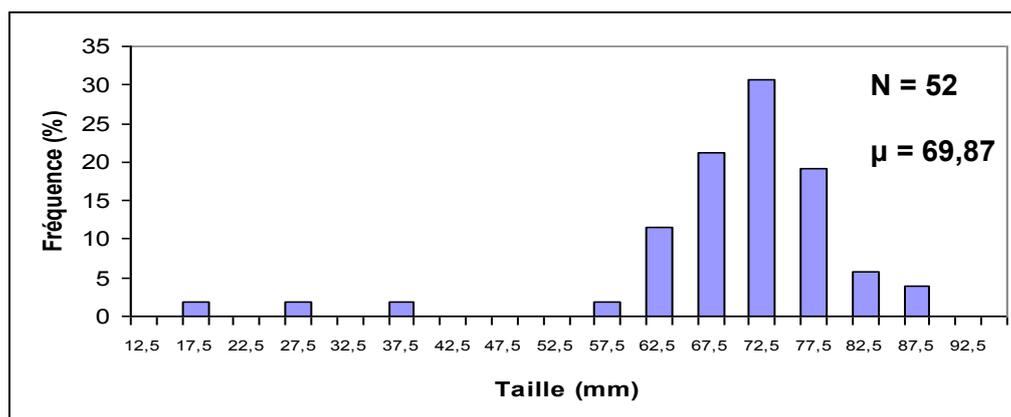


Figure. 72 Histogramme des fréquences de tailles de l’huître perlière *Pinctada radiata* à Maharès. (N : effectif, μ : taille moyenne en mm).

B.II. 2. Etude de l’épaisseur de la couche de nacre de l’huître perlière *Pinctada radiata*

Les travaux effectués prouvent la nécessité d’extraire une quantité importante de poudre de nacre afin de l’exploiter après sa valorisation. Or l’extraction de la nacre est d’autant plus facile et rentable si l’épaisseur de la couche de nacre est plus importante. Dans ce cadre, une étude de l’épaisseur de la couche nacrée de l’huître perlière *P. radiata* de 10 populations du littoral tunisien a été réalisée.

Sur chaque valve, quatre mesures ont été effectuées (E_c , E_b , $E_{1/2}$, E_f). Ces mesures ont montré que l’épaisseur de la couche de nacre est différente d’un endroit à un autre. En effet, l’épaisseur maximale de cette couche est observée au niveau de la charnière (3,2mm à Zarzis). En allant de la charnière vers le bord non nacré, cette épaisseur diminue progressivement.

D’une manière générale, l’épaisseur moyenne des valves est comprise entre 0,69 mm à Ajim et 1,34mm à Maharès. La valeur individuelle minimale a été relevée au niveau de La Marsa. Elle est de l’ordre de 0,32 mm. La valeur maximale est de 2,07 mm, enregistré toujours à Maharès. Quant aux valeurs de l’écart-type, elles oscillent entre 0,16 ; minimum enregistré au niveau du port de Zarzis, et 0,31 ; maximum observé au niveau du port de Hammamet (Tab. XV).

En se basant sur ce critère, le site de Maharès s’avère comme un site pilote puisqu’il fournit des huîtres ayant une couche nacrée relativement épaisse.

Tableau XV. Epaisseur moyenne de la nacre dans les différents sites d'études

Sites	Effectif	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
La Marsa	56	0,78	0,32	1,12	0,19
Port de Hammamet	53	1,12	0,51	1,50	0,31
Port de Monastir	80	0,98	0,36	1,38	0,18
Sfax	64	0,85	0,49	1,14	0,15
Kerkennah	120	0,81	0,41	1,34	0,22
Maharès	52	1,34	0,74	2,07	0,24
Skhira	77	0,94	0,33	1,91	0,29
Djerba	31	1,26	0,68	1,93	0,28
Ajim	80	0,69	0,63	1,52	0,23
Zarzis	80	0,91	0,53	1,27	0,16

B. III. Estimation du rendement en poudre de nacre

Dans le domaine orthopédique, la nacre est utilisée sous forme de poudre. Nous avons jugé nécessaire d'estimer le rendement en poudre de nacre à partir d'un échantillon naturel de *P.radiata* afin de prévoir les quantités nécessaires pour l'expérimentation animale et pour voir les potentialités de l'installation d'industriels, une fois que le produit sera commercialisable.

Pour ce faire, l'échantillon de Maharès a été pris en entier. Le choix d'un seul site d'une manière aléatoire est dû au fait que l'opération du raclage de la couche calcitique externe est très lourde. Cet échantillon pèse 1174,4g à l'état frais. La balance a enregistré une valeur égale à 223,29g comme poids de la poudre de nacre.

Ainsi le rendement en masse de poudre de nacre (R_{mp}) serait de :

$$R_{mp} = \frac{P_t}{P_n} \times 100 = \frac{223,29}{1174,4} = 19,01\%$$

Avec :

- P_t : poids total de l'échantillon frais (coquilles + masse viscérale)
- P_n : poids de la poudre de nacre

En se basant sur le rendement calculé, on peut dire que dans un kilogramme de *P.radiata* fraîche, nous obtiendrons 190,1 grammes de poudre de nacre.

B.IV.Variations saisonnières de la composition en acides gras totaux de la nacre de *Pinctada radiata*

B.IV. 1. Analyse des résultats

Nous avons étudié les variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides totaux de la nacre des échantillons de *P. radiata* récoltés durant la première campagne de pêche (2011-2012) à Maharès au niveau de la région sud Est tunisienne afin de fournir des informations sur la qualité des lipides de cette espèce. Les résultats de l'analyse des acides gras présentés dans l'annexe (4) la présence de vingt-cinq acides gras dans la poudre de nacre et ont révélé que le contenu des lipides totaux était de 25,49-87,97 mg/100g dans les différentes saisons.

La teneur en lipides étaient légèrement plus élevées en hiver et au printemps respectivement (87,97- 77,79 mg/100g) pendant la saison de reproduction de l'espèce (Février et mai) ($p < 0,05$) que dans la saison de croissance de la couche nacrée Novembre et Août (25,49-41,41 mg/100g).

Les acides gras saturés prédominent en hiver (61,66 mg/100 g), les niveaux les plus bas ont été trouvés à la fin de l'été et au début de l'automne. Les acides gras polyinsaturés ne subissent pas de grandes variations cette teneur est décroissante allant de l'hiver jusqu'à l'automne, (19,14 ; 17,23 et 15,42 mg/100g) respectivement en hiver, printemps et automne. La quantité la plus faible en AGPI est enregistrée pendant l'été à 7,79 mg/100g et ont montré une tendance saisonnière semblable aux niveaux de la teneur totale de n-3 et de n-6 étaient bas en hiver, puis a augmenté de manière significative entre le printemps et la saison d'automne ($p < 0,05$) en gardant toujours la quantité n-3 plus élevée que la quantité de la série n-6.

Les changements saisonniers dans les acides gras mono-insaturés sont moins importantes (3 à 34,97mg/100g) avec une quantité assez élevée au printemps par rapport aux autres saisons d'automne ($p < 0,05$).

Les plus importantes quantités d'acides gras saturés: C14:0 (2,66 à 3,08%), C16:0 (de 20,11 à 32,93 %) et C18:0 (de 8,79 à 34,02%) on enregistre une quantité faible au printemps par

rapport aux autres saisons et les acides gras mono-insaturés: une teneur élevée de C15:1 au printemps par rapport au reste des saisons C16:1 (2,02 à 2,96%), C18:1 (4,74 à 8,14%) et C20:1 (de 0,24 à 0,70%) ont montré des profils saisonniers similaires. Les acides gras polyinsaturés les plus abondantes (AGPI) sont les suivants: C20:5 (n-3) (0,6 à 1,45%), C22:6 (n-3) (5,51 à 13,13%) avec une quantité élevée au printemps et en automne, C22:5n-3 (1,44 à 11,19) avec la quantité la plus élevée enregistrée en automne (11,19%) similaire à celle du DHA (11,58) et de 18:3(n-3) (de 0,12 à 2,96 %). Les profils saisonniers de ces acides gras étaient similaires à ceux des AGPI. Les (n-6) AGPI contiennent des pourcentages faibles de 20:4 (n-6) et de 18:2 (n-6), la quantité la plus élevée enregistrée en C20:2(n-6) de 0,31 à 3,34 et les variations saisonnières de ces dernières suivent celle de (n-6) AGPI de très près. Les pourcentages de la série (n-3) AGPI sont significativement plus élevés que ceux de (n-6) AGPI ($p < 0,05$) (Annexe.IV). Nous avons remarqué aussi la présence de non-interrompue méthylène diénoïque (NMID) (C22: 2) : C22: 2i (0,29% et 1,47) et C22: 2j (0,26 % et 0,65%) en petites quantités.

B.IV. 2. Analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) de la variation de la composition en acides gras totaux de la nacre de *Pinctada radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons (Fig.73 et 74, tab XVI)

Pour cette ACP, nous avons utilisé vingt cinq descripteurs, leurs représentations sur un plan F1 x F2 absorbent 36,14% de la variance totale (Fig. 73). L'axe F1, absorbant 21,35% de la variance totale, sélectionne négativement la série n-3 : C20:5n-3 (EPA), C20:4n-3, C22:6n-3 (DHA), C22:5n-3, C18:3n-3 et de la série n-6 ; C20:2n-6, C20:4n-6 (ARA), et les acides gras monoinsaturés C15:1, C16:1, C18:1 et C20:1 qui coïncident avec la saison automnale et printanière sur le plan factoriel (1 x 2) de la projection des différents individus qui présentent les différentes saisons, et positivement les acides gras saturés, distingués essentiellement par C15:0, C16:0, C18:0 et C22:0.

Quant à l'axe F2, absorbant 14,80% de la variabilité, sélectionne négativement la série n-6, les acides gras saturés et monoinsaturés et positivement la série n-3.

Selon le plan factoriel (1x3) L'axe F3, absorbant 32,38 % de la variance totale, avec 21,35% pour l'axe 1 et 11,03% pour le second (Fig. 74). L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 98,52 % de la variance totale. Selon ce plan l'axe F1 sélectionne positivement les acides gras

saturés, monoinsaturés et la majorité des acides gras polyinsaturés qui coïncide avec la saison surtout estivale et automnale selon la projection des individus

A partir de cette association, nous pouvons déduire la présence des différents acides gras dans les différentes saisons selon la projection des individus mais une forte corrélation positive entre les acides gras polyinsaturés composée essentiellement de la série n-3 riche en EPA et DHA qui coïncide avec la saison automnale suivant les deux plans factoriels (1×2) et (1×3).

Tableau XVI. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Nacre (AGT).

Nacre (AGT)	F1	F2	F3
Valeur propre	5,337	3,700	2,757
Cumuls de la variance expliquée (%)	21,347	36,145	47,174

B. V. Variations saisonnières de la composition en acides gras des catégories lipidiques essentielles de la nacre de *P. radiata*.

B.V.1. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PC de la nacre de *P. radiata*.

B. V.1. a. Analyse des résultats

L'analyse de la composition en acides gras des catégories phospholipidiques PC ou lécithine des lipides totaux extraits à partir de la nacre de *P. radiata* a montré une prédominance d'étude des acides gras insaturés (AGI) par rapport aux acides gras saturés (AGS) durant la saison hivernale et automnale (Annexe. 5).

Six acides gras majeurs avec des variations significatives ($p < 0.05$) ont été identifiés au sein de la PC durant les quatre saisons (Annexe. 5). Parmi les AGS, nous avons retenu le C16 :0 (9,96-24,17%) et le C18 :0 (4,61-15,19%). Les C15 :1 (1,66-4,39%) ; C16 :1 (2,2-4,68%) ; C18 :1n-9 (1,26-4,11) et C22 :1 (1,98-5,13%) prédomine parmi les AGMI et présentent des pourcentages élevés surtout en hiver . Le C18 :2n-6 (0,49-2,92 %) est le représentant principal des AGPI n-6. Il en est de même pour EPA (0,86-9,26%) et le DHA (3,86-9,51%) également C22:3n-3 (3,14-11,21) et C22: 5n-3 (1,95-17,40) parmi les AGPI de la série n-3.

Les niveaux les plus élevés des AGPI des PC ont été enregistrés entre la fin de l'automne (Août) et le milieu de l'hiver (Février) ($p < 0,05$), puis ont légèrement diminué et sont restés faibles respectivement au printemps et en été.

Les AGPI des PC ont montré une relation significative avec les changements saisonniers de la série n-3 des PC. Ils décroissent de 24,03% (0,59 mg/100g) au début de l'étude (Février) jusqu'à 16,76% (0,25mg/100g) au mois de mai, en restant faibles jusqu'à aout 14,66% (0,1mg/100g), et enfin augmentent jusqu'à Novembre 42,18% (1,84 mg/100g).

B.V.1.b. Analyse en composante principale (ACP)

Les résultats de l'ACP de la variation de la composition en acides gras des PC de la nacre de *pinctada radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons (Fig.75, Tab XVII) nous ont permis de retenir les trois premiers axes qui contribuent ensemble par 41,20% à la variance totale. Le premier axe contribue à lui seul par 26,63 % alors que le deuxième ne contribue que par 14,57 % selon le plan factoriel (1×2).

Selon le plan factoriel (1 ×3), le pourcentage d'inertie expliqué par les deux premiers axes est de 37,85% avec 26,63% pour l'axe 1 et 11,22% pour le second (Fig. 76, Tab. XVII). L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 79,05% de la variance totale.

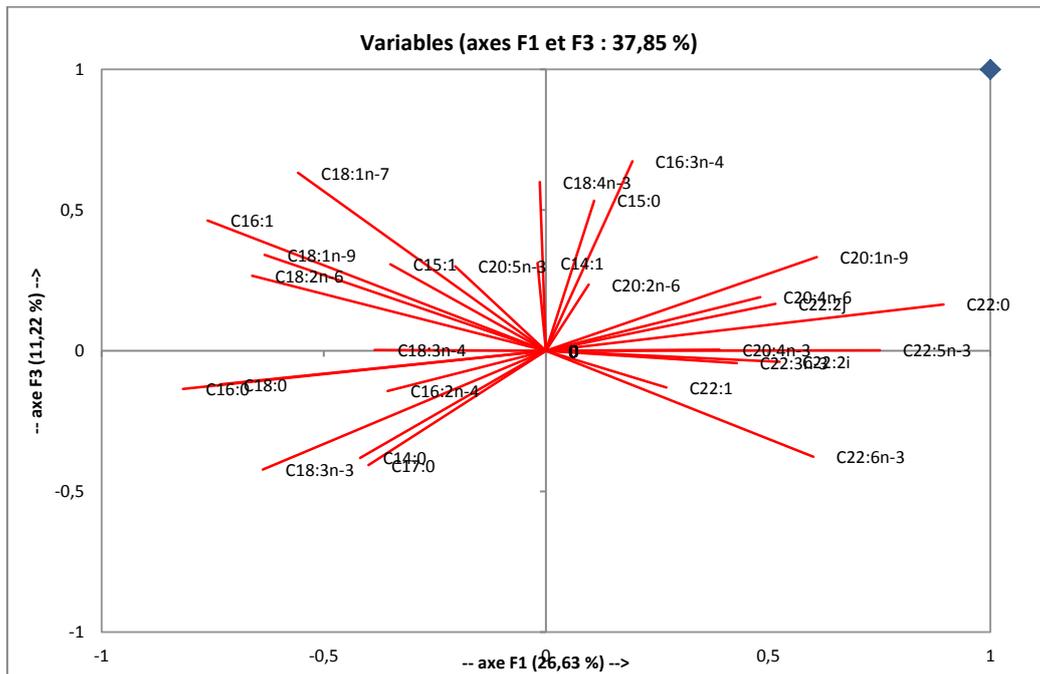
L'axe factoriel 1 sélectionne négativement les acides gras saturés qui coïncident avec les saisons estivales et printanières suivant la projection des individus sur le plan factoriel (1 ×2) et positivement les acides gras polyinsaturés correspondant surtout à la série n-3 et la série n-6 qui coïncident avec la saison d'automne par contre l'axe factoriel 2 sélectionne positivement les différents acides gras monoinsaturés, C15 :1, C16 :1, C18 :1n-9 et C18 :1n-7 correspondants à la saison hivernale selon la projection des individus.

Sur le plan factoriel (1 ×3) l'axe 3 sélectionne positivement les acides gras polyinsaturés essentiels de la série n-3 et n-6 : EPA, DHA et ARA ainsi que C22 :3n-3, C22 :5n-3 et C20 :2n-6 correspondant à la saison automnale.

Tableau XVII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Nacre (PC).

Nacre (PC)	F1	F2	F3
Valeur propre	7,456	4,080	3,142
Cumuls de la variance expliquée (%)	26,629	41,200	52,421

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

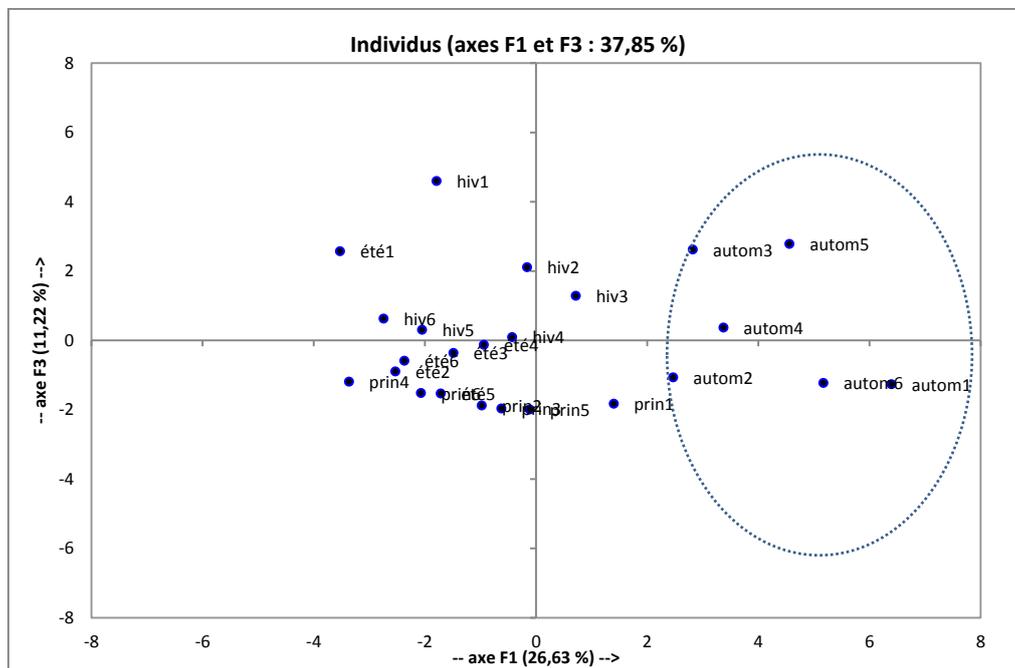


Figure.76 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PC de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

B.V.2. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PE de la chair de *P. radiata*.

B. V. 2.a. Analyse des résultats

Les variations saisonnières des acides gras des PE sont présentées dans l'annexe (6). Les valeurs les plus élevées d'AGPI ont été enregistrées en hiver-automne (1,43 -1,16 mg/100g des acides gras totaux) et les plus faibles en été et au printemps respectivement (0,35 et 0,5 mg/100g des acides gras totaux) ($p < 0,05$). Le pourcentage des AGS riche principalement en C16 :0 et C18 :0 allait de 0,53 au printemps et 0,97 mg/100g en automne. Les acides gras polyinsaturés sont riches principalement en acides gras de la série n-3.

Nous avons observé que la composition en acide gras de *P. radiata* variait tout au long des saisons. Les acides gras polyinsaturés de la série n-3 sont principalement composés des EPA (C20 :5n-3), DPA (22:5n-3: acide docosapentaénoïque), C22:3n-3 (acide docosatriénoïque) et DHA des différences significatives saisonnières ($P < 0,05$) ont été observées parmi les autres acides gras, les acides gras de la série n-3 atteignent leur maximum en automne.

B.V.2.b. Analyse en composante principale (ACP)

Pour cette ACP, de la variation de la composition en acides gras des PE de la poudre de nacre *Pinctada radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons nous avons utilisé les différents acides gras comme descripteurs, leurs représentations sur un plan F1 x F2 absorbent 41,25% de la variance totale (Fig. 77, Tab. XVIII).

L'axe F1, absorbant 26,46% de la variance, sélectionne négativement l'EPA qui coïncide avec la saison d'hiver sur la projection des individus sur le plan factoriel (1×2) alors que l'axe factoriel 2 absorbant 14,79 % de la variance totale sélectionne positivement le groupe des acides gras essentiels distingués essentiellement par DHA, DPA et ARA ainsi que C20 :4n-3 correspondant à la saison d'automne selon la projection des individus sur le même plan.

Ceci s'explique aussi selon le plan factoriel (1×3) (Fig.78, Tab.XVIII) l'axe factoriel F3 sélectionne positivement le groupe des acides gras essentiels distingués par EPA, DHA, DPA et ARA correspondant à la saison automnale sur la projection des individus selon le plan factoriel (1×3).

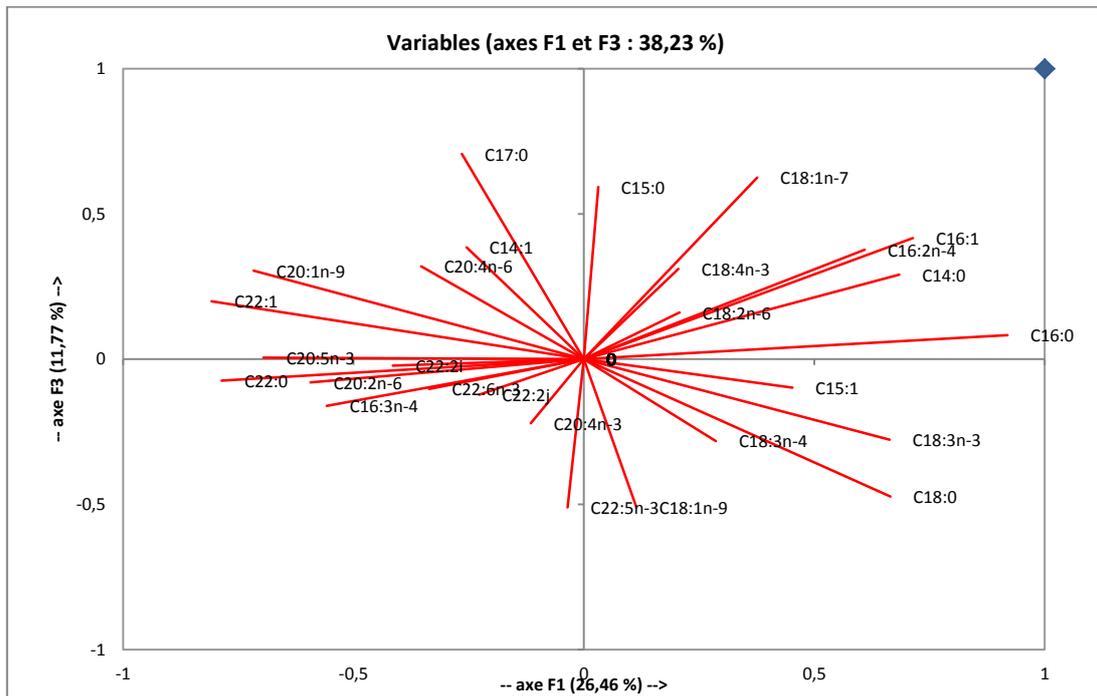
L'axe factoriel F3, absorbant 11,77% de la variabilité avec l'axe F1, absorbant 26,46% absorbent 38,23% de la variance totale.

A partir de cette association, nous pouvons déduire une forte corrélation positive sur la projection des individus que ce soit sur le plan F1 x F2 et F1 x F3. L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 79,48 % de la variance totale.

Tableau XVIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Nacre (PE).

Nacre (PE)	F1	F2	F3
Valeur propre	7,145	3,992	3,177
Cumuls de la variance expliquée (%)	26,465	41,251	53,017

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

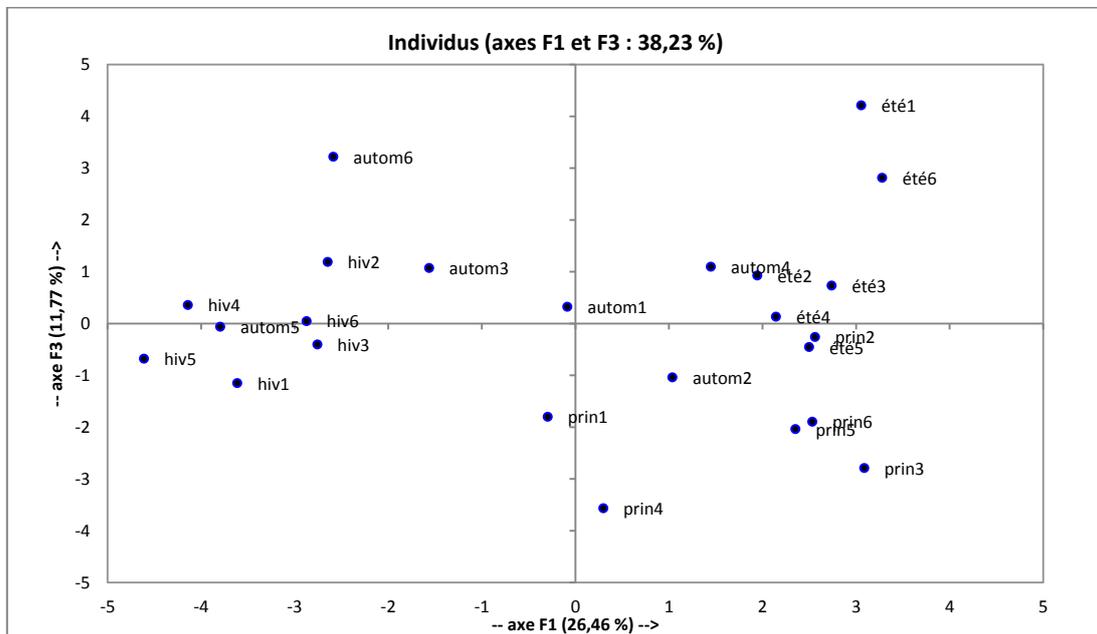


Figure.78 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PE de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

B.V.3. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PI de la nacre de *P.radiata*.

B.V. 3. a. Analyse des résultats

L'analyse de la composition en acides gras des catégories phospholipidiques PI des lipides totaux extraits à partir de la nacre de *P.radiata* a montré une prédominance d'étude des acides gras insaturés (AGI) par rapport aux acides gras saturés (AGS) durant la saison hivernale et automnale et inversement pour les saisons printanière et estivale, nous avons enregistré pour les acides gras polyinsaturés 1.21mg/100g en hiver contre 0,64mg/100g des acides gras saturés de même pour la saison d'automne nous avons enregistré 1,16mg/100g des AGS des acides gras totaux contre 1,57 mg/100g d'AGPI (Annexe. 7).

Parmi les AGS, nous avons retenu le C16 :0 (13,80-25,54%) et le C18 :0 (6,85-18,21 %) (4,61-15,19%). Les C15 :1 (1,20-3,25%) ; C16 :1 (3,80-5,10%) ; C18 :1n-9 (2,03-4,99) et C22 :1 (1,61-13,48%) prédominent parmi les AGMI et présentent des pourcentages élevés surtout en hiver et en été.

Le C18 :2n-6 est le représentant principal des AGPI n-6. Il en est de même pour EPA (1,04-12,56%) et le DHA (4,93-12,64%) également C22: 5n-3 (1,45-10,13) parmi les AGPI de la série n-3 est élevé par rapport à la série n-6 et durant toute l'année. Le taux le plus élevé en AGPI de la série n-3 est enregistré en hiver et en automne et se traduit par la somme des EPA et DHA.

B.V.3.b. Analyse en composante principale (ACP)

Les résultats de l'ACP de la variation de la composition en acides gras des PI de la nacre de *P.radiata* en fonction des saisons (Fig.79, Tab. XIX) nous ont permis de retenir les deux premiers axes qui contribuent ensemble par 41,36% à la variance totale.

Le premier axe contribue à lui seul par 27,11 % alors que le deuxième ne contribue que par 14,24 % selon le plan factoriel (1 × 2).

Cette représentation montre que l'axe F1 est clairement lié aux acides gras suivants C18:4n-3, C22:0, C22:1, C20:2n-6, C20 :1n-9 ainsi que C20 :5n-3, C20:4n-6 et C22 :6n-3, C22 :5n-3

alors que l'axe F2 est plutôt lié aux acides gras saturés C15 :0, C16 :0, C18 :0, C17 :0 en les sélectionnant négativement correspondant aux saisons d'été et du printemps selon le plan de la projection des individus.

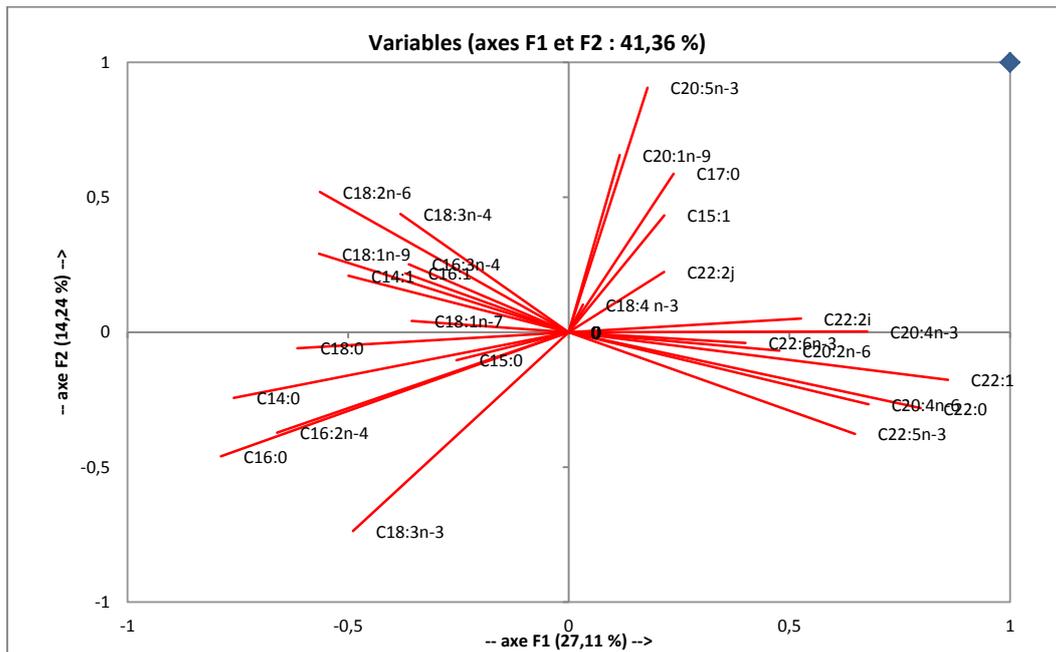
Suivant le plan factoriel (1 × 3) (Fig.80, Tab XIX), l'axe factoriel F1 absorbe par 27,11 % et l'axe factoriel F3 absorbe 11,54% de la variance totale, le cumul autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbent 80,04 % de la variance totale.

Selon le plan factoriel (1 × 3), l'axe F1 sélectionne positivement les acides gras essentiels de la série n-3 EPA, DHA, DPA et ARA ainsi que C20 :4n-3 ce qui coïncide avec la saison automnale et hivernale sur le plan de la projection des individus. Ces résultats confirment les résultats précédent (annexe VI), l'axe F3 est lié principalement aux différents acides gras saturés et monoinsaturés correspondant à la saison de l'été et celle du printemps.

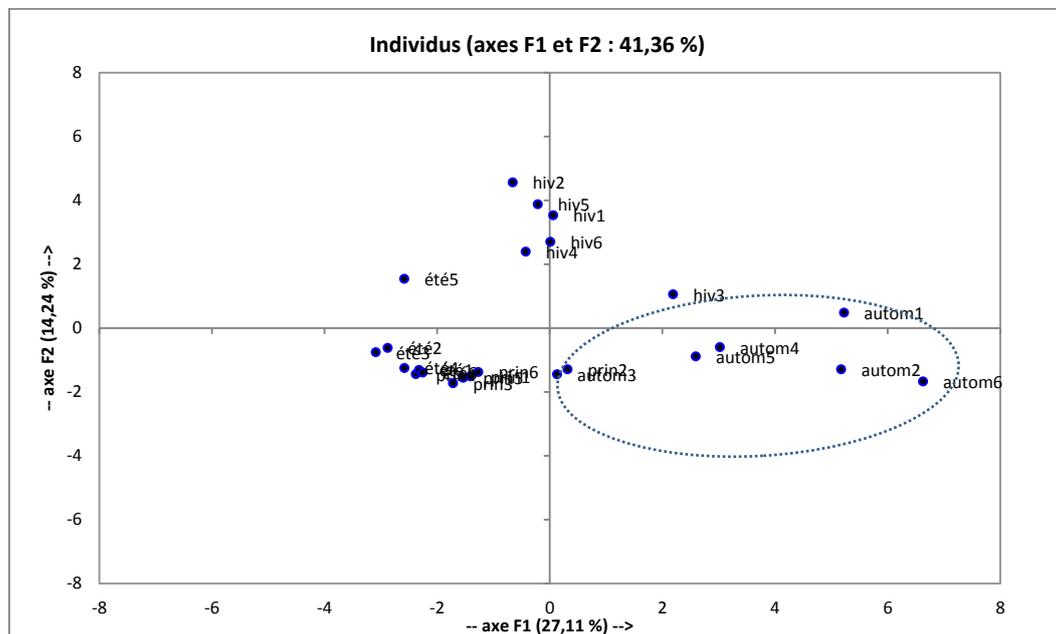
Tableau XIX. Pourcentage de contribution à la variance des principaux axes factoriels.
Nacre (PI).

Nacre (PI)	F1	F2	F3
Valeur propre	7,320	3,846	3,117
Cumuls de la variance expliquée (%)	27,113	41,356	52,900

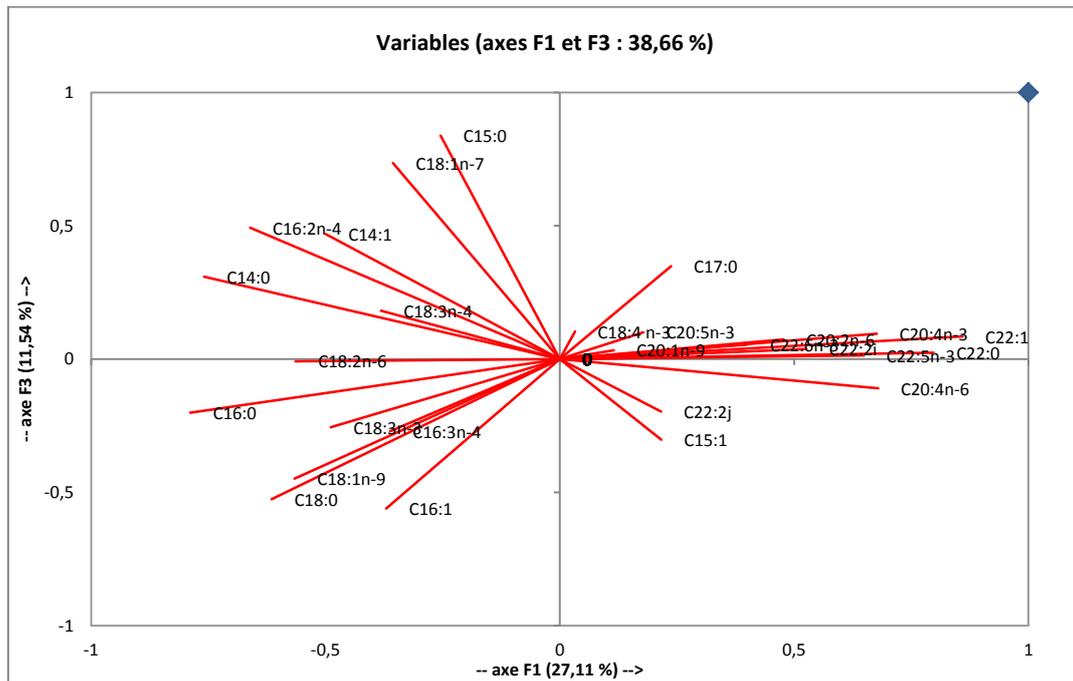
Projection des variables sur le plan factoriel (1×2).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)



Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

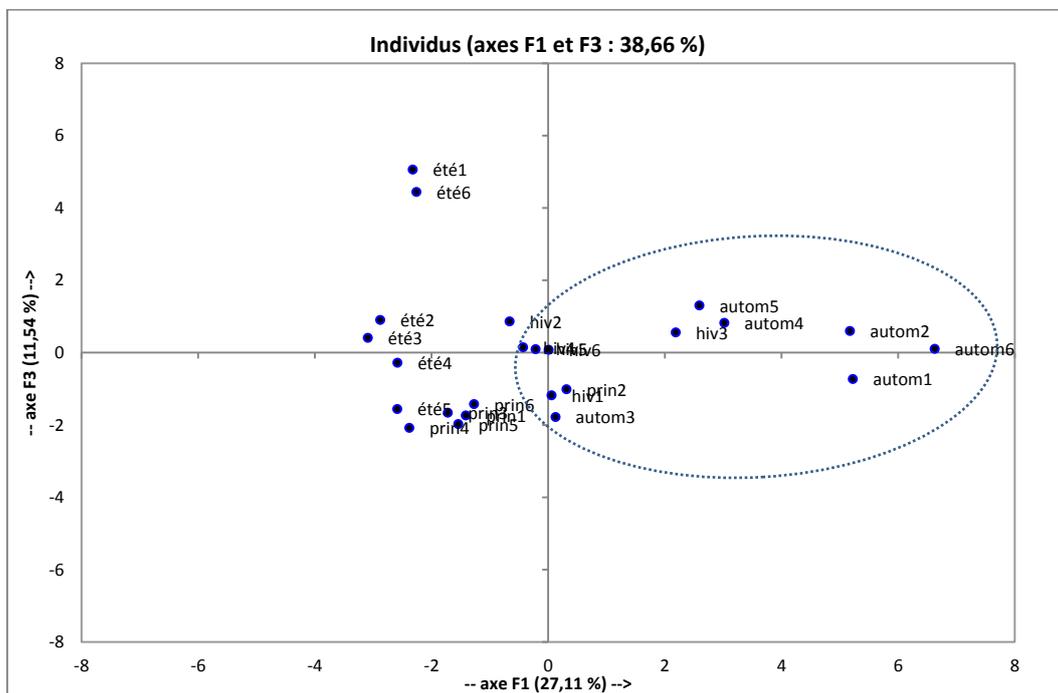


Figure. 80 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PI de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

B.V.4. Variations saisonnières de la composition en acides gras des PS de la nacre de *P.radiata*.

B.V. 4.a. Analyse des résultats

L'analyse de la composition en acides gras des catégories phospholipidiques PS des lipides totaux extraits à partir de la nacre de *P.radiata* a montré que les AGT de ces PS sont plus élevés en été et en automne (3,96 et 3,58 mg/100g) respectivement qu'en hiver et printemps (2,79 et 2,09 mg/100g) également une prédominance légère des acides gras insaturés (AGI) par rapport aux acides gras saturés (AGS) durant la saison hivernale et automnale et inversement pour les saisons printanière et estivale (Annexe. 8).

Parmi les AGS, nous avons retenu ceux qui présentent le pourcentage le plus élevé : le C16 :0 (13,23-27,38 %) et le C18 :0 (5,57-16,77 %) et les plus faibles pourcentages sont enregistrés en automne.

Les C16 :1 (2,79-4,62%) ; C18 :1n-9 (1,77-7,85) et C22 :1 (1,15-6,46%) prédominent parmi les AGMI et présentent des pourcentages élevés surtout en hiver et en été.

Le C18 :2n-6 est le représentant principal des AGPI n-6. Il en est de même pour les pourcentages des EPA (0,75-10,94%) et le DHA (4,33-13,66%) également C22 :5n-3 (1,78-21,60) parmi les AGPI de la série n-3 qui sont élevés par rapport à la série n-6 et durant toute l'année .le taux le plus élevé en AGPI de la série n-3 est enregistré au printemps et en automne.

B.V.4.b. Analyse en composante principale (ACP)

Les résultats de l'ACP de la variation de la composition en acides gras des PS de la nacre de *P.radiata* en fonction des saisons (fig.81) nous ont permis de retenir les deux premiers axes qui contribuent ensemble par 39,95% à la variance totale.

Le premier axe contribue à lui seul par 26,28 % alors que le deuxième ne contribue que par 13,67 % selon le plan factoriel (1×2).

Cette représentation montre que l'axe F1 est clairement lié aux acides gras suivants C18:3n-4, C18:0, C16:0, C18:3n-3, C18 :2n-6 ainsi que C22 :5n-3 et le DHA C22 :6n-3 que sélectionne cet axe négativement correspondant à la saison d'automne sur la projection des individus,

alors que l'axe F2 est plutôt lié aux acides gras saturés C15 :0, C16 :1, C15 :1, C17 :0 ainsi que l'EPA et l'ARA en les sélectionnant positivement correspondant à la saison d'hiver selon le plan de la projection des individus du plan factoriel (1 × 2).

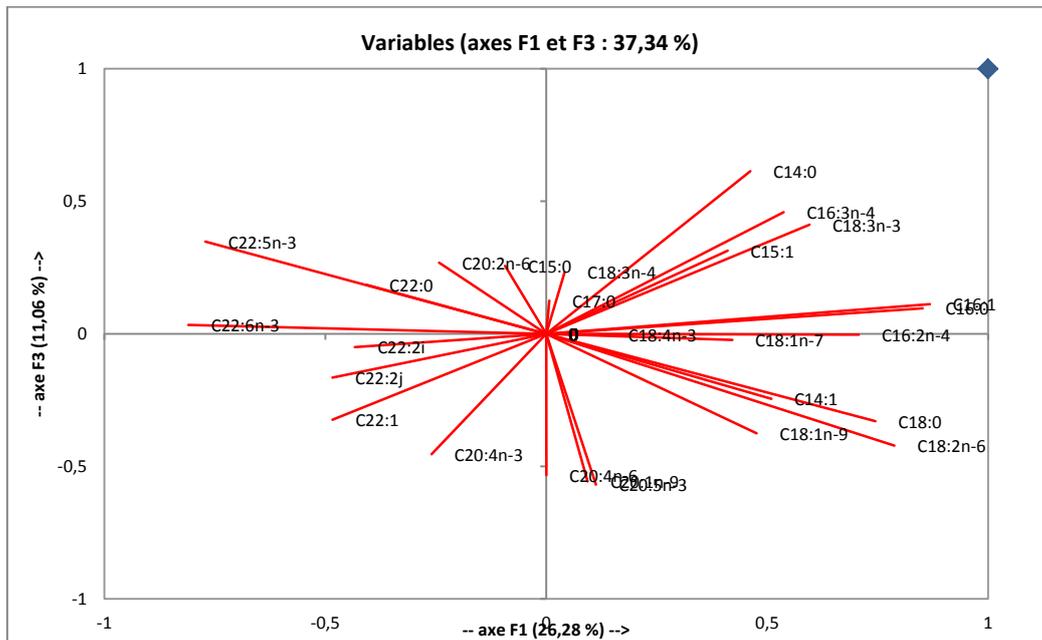
Suivant le plan factoriel (1 × 3) (Fig.82), l'axe factoriel F1 absorbe par 26,28 % et l'axe factoriel F3 absorbe 11,06 % de la variance totale (Tab. XX), le cumul autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbent 77,29 % de la variance totale.

Selon le plan factoriel (1 × 3), l'axe F1 sélectionne positivement les acides gras essentiels de la série n-3 EPA, et ARA ce qui coïncide avec la saison estivale et hivernale sur le plan de la projection des individus, inversement l'axe F3 sélectionne négativement le DHA et le DPA correspondant à la saison d'automne et celle du printemps sur la projection des individus du plan factoriel (1 × 3).

Tableau XX. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Nacre (PS).

Nacre (PS)	F1	F2	F3
Valeur propre	7,096	3,690	2,987
Cumuls de la variance expliquée (%)	26,280	39,948	51,010

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

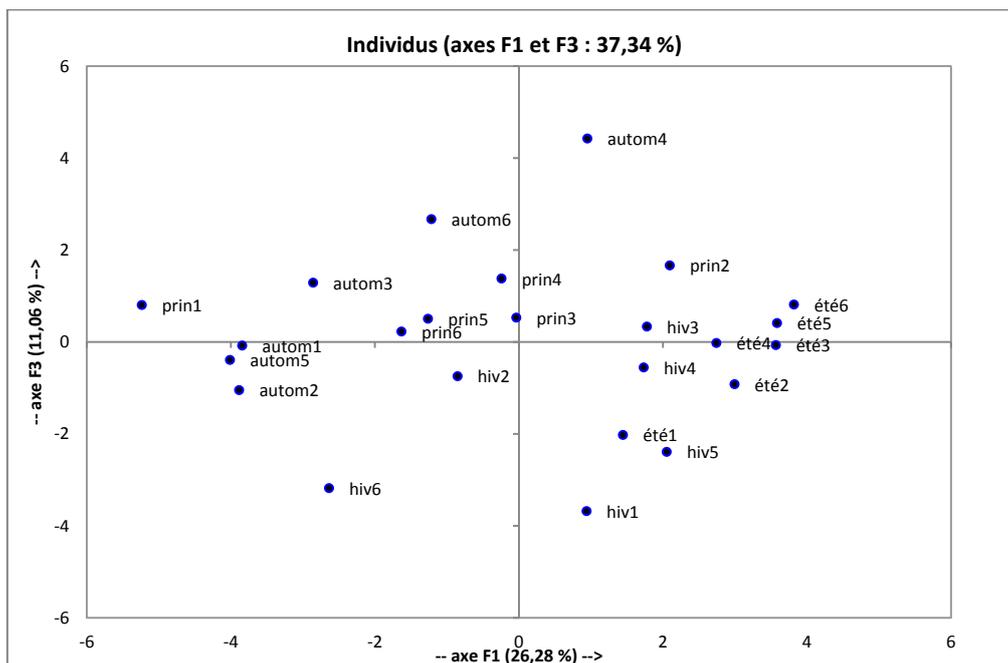


Figure. 82 Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des PS de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

C. Discussion

C. I. Variations saisonnières de la teneur en protéines totales de la nacre de *Pinctada radiata*

La nacre est constituée de carbonate de calcium sous forme aragonite (90%) et de matière organique (5%), plus des traces d'eau et de différents ions. La matière organique est constituée entre autres de différentes protéines, dont la composition et la structure ne sont pas totalement connues. Il a été montré que ces protéines induisent la formation de la partie minérale de la nacre et déterminent sa structuration.

Le taux de protéines dans la nacre ne varie pas beaucoup au cours des saisons ces protéines présentent 1,14 % de la matière organique qui présente à son tour 5% de la nacre. Les protéines présentes dans la nacre induisent la formation du carbonate de calcium sous forme aragonite, bien que cette structure soit moins stable que celle de la calcite, dans les conditions normales de température et de pression (Bowen et Tang, 1996 ; Feng *et al.*, 2000). Selon les hypothèses avancées, la partie soluble des protéines est responsable de la formation du cristal dans une morphologie caractéristique de la protéine, alors que la partie insoluble détermine la densité, la taille et la quantité des cristaux (Marin *et al.*, 2008 ; Vallée, 2012).

La matière organique contient aussi les pigments organiques, de type caroténoïde, qui donnent leur couleur aux nacres. Dans les mollusques, ils sont complexés à des protéines pour former des caroténoprotéines. Cette complexation peut modifier la couleur initiale du pigment et donner des teintes allant du jaune au violet.

Les protéines contenues dans la composition chimique de la nacre laissent la possibilité d'adsorption de la nacre sur l'électrode d'or (Hamza *et al.*, 2007)..

La nacre est organisée selon un modèle unique: Brique et Mortier La nacre est formée de deux parties:

-Composante minérale : Carbonate de calcium cristallin sous forme d'aragonite pure pouvant combler l'os.

-Composante organique : Matrice hydrosoluble et insoluble (Lopez *et al.*, 1992, 1995).Le produit hydrosoluble responsables de l'activité biologique de la nacre comprend un mélange

de protéines, qui présentent des activités biologiques de stimulation de la prolifération cellulaire, en particulier des ostéoblastes, des chondrocytes, des kératinocytes et des fibroblastes. Ces protéines sont non cytotoxiques, elles augmentent l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes notamment destiné à augmenter la régénération des tissus notamment osseux, cartilagineux ou cutanés (Lopez *et al.*, 1997). Ce sont les protéines intramembranaires qui vont ménager des pores qui permettent à certains ions ou petites molécules de traverser la bicouche lipidique du cytoplasme. Ils permettent un mouvement plus rapide que les pompes et les transporteurs

Des auteurs ont fait des études sur les protéines de la nacre comme Nacrein a été la première protéine de coquille de mollusque à avoir été séquencée et elle est sans doute encore la protéine la plus étudiée (Miyamoto *et al.*, 1996, 2003, 2005 ; Miyashita *et al.*, 2002 ; Matsushiro & Miyashita, 2004 ; Takeushi & Endo, 2005) également une autre protéine de 40 kDa a été décrite chez la même espèce, N40 (Yan *et al.*, 2007). P20 est une protéine extraite de la couche nacrée de *Pinctada margaritifera* (Bédouet *et al.*, 2001) (tab.XXI)

Tableau XXI. les protéines partiellement caractérisées, associées aux coquilles de mollusques

(modifié d'après Marin *et al.*, 2008). (A) Protéines associées à l'aragonite. « Bioch. » indiquent que ces protéines ont été caractérisées par biochimie (SDS-PAGE)

Classe	Espèce	Protéine	Microstructure (polymorphe)	Observation	Référence
Bivalve	<i>P. maxima</i>	P20	Nacre (A)	Biochim.	Bédouet <i>et al.</i> , 2001
	<i>P. margaritifera</i>	WSM peptides	Nacre (A)	Biochim.	Bédouet <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. fucata</i>	N40	Nacre (A)	Biochim.	Yan <i>et al.</i> , 2007

Vallée (2012) montre également l'importance des protéines de la nacre. Ces protéines fibreuses sont associées à de nombreuses autres molécules actives dont des facteurs de croissance et surtout la décorine, protéine impliquée dans la régénération des tissus. C'est sur cette trame organique que les minéraux viennent se fixer, tel le carbonate de calcium qui cristallise sous forme d'aragonite très pure. A partir de ces résultats un brevet sur un complément alimentaire à partir de la nacre qui est utilisée par VEGMARINE, est extraite d'un mollusque nacrier géant, la *Pinctada maxima*, qui vit dans l'océan Pacifique.

De fabrication française et brevetée, ENERGOCAPS PURE NACRE est un complément alimentaire de type modificateur de terrain, à prédominance ostéo-articulaire et musculaire.

C. II. Qualité de la nacre

L'analyse des structures démographiques de la population tunisienne de l'huître perlière *P.radiata* au niveau de dix sites d'étude montre, d'une manière globale, la dominance des individus de grande taille. Les naissains, ayant une taille inférieure à la taille de la première maturité sexuelle comprise entre 15 et 20 mm (Tranter, 1958b ; Tlig-Zouari, 1993 ; Khamdan, 2001), sont présents dans la majorité des localités (port de Hammamet, port de Monastir, Sfax, Kerkennah, Maharès, Skhira, port de Zarzis) mais avec une faible fréquence qui ne dépasse pas généralement 10%.

Les valeurs de la taille moyenne varient entre 49,90 mm (La Marsa) et 72,71 mm (port de plaisance Hammamet sud). Ces valeurs sont plus importantes que celles mentionnées par Tlig-Zouari en 1993 (32,7 mm) et Tlig-Zouari & Zaouali en 1998 (35,02 mm) pour les Pintadines des îles Kerkennah. Cependant, elles restent inférieures à la valeur de 74,83 mm enregistrée à Njila (Irathni, 2006). La comparaison des valeurs de la taille moyenne de la population Tunisienne de *P.radiata* avec celles des populations de la Syrie et de Grèce montre que, à l'exception des individus de Hammamet (72,71 mm) et de Maharès (69,87 mm), les individus collectés présentent une taille moyenne inférieure à celle des Pintadines du Grèce (69,68 mm). Toutefois, la taille moyenne mentionnée en Syrie (56,63 mm) reste inférieure aux valeurs que nous avons pu enregistrer à l'exception de deux stations à savoir : La Marsa (49,90 mm) et le port de Monastir (56,43 mm).

En se basant sur les structures démographiques des populations tunisiennes de *P.radiata*, on peut déduire que le site de La Marsa ne peut pas être considéré comme un site pilote pour l'échantillonnage de ce bivalve puisqu'il fournit des huîtres de petite taille. Cette taille présente un obstacle majeur dans l'extraction de la couche de nacre.

Les valeurs de la taille des individus collectés oscillent entre 6,48 mm (port de Monastir) et 104,37 mm (port de plaisance Hammamet sud). Cette taille maximale observée présente le record actuel de cette espèce. En effet, elle est supérieure à celles observées par Seurat (1929) au niveau de la mer des Bibans, par Tlig-Zouari (1993) aux îles Kerkennah (74 mm), par

Irathni (2006) (100,5 mm) à Njila et par Yassien *et al.* (1998 et 2000) pour la Pintadine de la mer rouge (93,2 mm) et de la Méditerranée orientale (64 mm).

La dominance des individus de grande taille accompagnés de naissains dans la majorité des sites d'étude nous amène à penser que *la Pinctadine* a trouvé sur les côtes tunisiennes un milieu adéquat pour sa croissance et son développement.

En outre, la présence de cette espèce dans les stations portuaires (port de Hammamet, port de Monastir et port de Zarzis) peut constituer un élément supplémentaire de confirmation, d'une part le rôle joué par le trafic maritime dans l'installation de l'huître perlière *P.radiata* et d'autre part la capacité de cette espèce à supporter la pollution marine. Ceci met en évidence, par conséquent, l'intérêt de son utilisation comme espèce bio-indicatrice dans les programmes de bio-surveillance.

Ces différences observées peuvent être expliquées par les variations des facteurs environnementaux d'un site à un autre. En effet, les facteurs physico-chimiques, principalement la température et la salinité, ont un effet important sur le développement et la survie des Mollusques (Parache et Massé, 1987 ; Aloui-Bejaoui, 1998 ; O'Connor et Lawler, 2004).

La morphologie de la coquille est fortement influencée par la richesse nutritive du milieu et la disponibilité de la nourriture pour chaque individu. De ce fait, la croissance est d'autant plus importante lorsque la densité des individus dans la population est plus faible (Zanette et Deslous-Paoli, 1983 ; Brown et Hartwich, 1998 ; White *et al.*, 1990). Selon Barillé (1996), l'âge des individus peut également affecter les modalités de croissance des bivalves. En effet, les adultes sont appelés à stocker des réserves pour la gamétogenèse ce qui engendre un ralentissement de la croissance de la coquille. Ce problème n'est pas posé chez les individus les plus jeunes où toute l'énergie est destinée à la croissance.

L'épaisseur moyenne de la nacre est comprise entre 0,69 mm à Ajim et 1,34 mm à Maharès. Les valeurs individuelles fluctuent entre 0,32 mm (La Marsa) et 2,07 mm (Maharès). En se basant sur ce critère, le site de Maharès s'avère comme un site pilote puisqu'il fournit des huîtres ayant une couche nacrière relativement épaisse. En revanche, le site d'Ajim ne peut pas être retenu dans les opérations d'échantillonnage de ce bivalve.

Puisque nous ne pouvons pas comparer l'épaisseur avec d'autres populations de *P.radiata* fautes de références bibliographiques, nous avons voulu confronter nos résultats avec ceux de *Pinctada maxima*.

En effet, cette huître perlière géante se caractérise par une couche de nacre épaisse de l'ordre de 2cm, ce qui explique la possibilité d'implanter in vivo des fragments entiers de nacre (Milet *et al.*, 2004). L'épaisseur maximale de la nacre que nous avons pu enregistrer chez *P.radiata* est dix fois plus petite que celle observée chez *P. maxima*, ce qui rend infaisable l'implantation de fragments entiers de nacre et la nécessité du passage à la forme poudre pour son utilisation en orthopédie.

C. III. Variation saisonnière des lipides totaux et des glycérophospholipides de la nacre de *Pinctada radiata*

Dans notre étude nous décrivons la composition des acides gras des lipides totaux de la poudre de nacre de *Pinctada radiata*. Nous avons étudié ses glycérophospholipides (PE, PI, PS et PC) pour avoir une idée sur la saison la plus riche en acides gras polyinsaturés et qui pourraient être à l'origine de son pouvoir ostéogénique.

La composition en acides gras des lipides totaux d'invertébrés dépend à la fois de la voie de la biosynthèse des acides gras dans leurs tissus et la composition des acides gras des sources de nourriture de l'espèce.

Dans les écosystèmes marins, différentes sources alimentaires comme le phytoplancton, le zooplancton, matière organique dissoute, détritiques, etc, permettent de fixer certaines formes d'acides gras qui peuvent être transférés, et ne peuvent donc être reconnus en consommateurs primaires (Dalsgaard *et al.*, 2003). La composition en acides gras et les voies de biosynthèse sont essentiellement différents dans les bactéries, les micro-algues photoautotrophes, et les animaux hôtes (Pereira *et al.*, 2003).

Les résultats de la variation saisonnière de la composition en acides gras des lipides totaux montrent une claire variation ($P < 0.05$) de cette composition en montrant son élévation en hiver et en printemps par rapport aux autres saisons avec une élévation des acides gras saturés formés essentiellement de C16 :0 et C18 :0 en hiver et moins en printemps. Hamza et Zouari (2008) ayant travaillé sur le corail rouge (*Corallium rubrum*), espèce typiquement méditerranéenne montre que le corail et la nacre figurent ainsi parmi les biomatériaux les plus prometteurs en chirurgie osseuse.

Ainsi le corail est un autre substitut osseux d'origine marine résorbable composé de carbonate de calcium issu de la partie minérale du corail naturel. Sa biocompatibilité et son ostéointégration sont excellentes quel que soit le type de corail (Demers *et al.*, 2002).

Andrey *et al.*, (2007), ayant travaillé sur la composition des acides gras des lipides totaux sur douze espèces de coraux mous zooxanthelles des genres *Sarcophyton*, *Lobophytum*, *Cladiella*, *Lytrophyton*, *Cespitularia*, et *Clavularia*, et le corail hermatypique *Caulastrea tumida* montre que C16 :0 figure parmi les acides gras saturés essentiel avec une teneur élevée également confirmé par Papina *et al.*, 2003. Ce résultat est similaire à ce que nous avons trouvé cet acide gras figure parmi le reste des acide gras saturés : C14 :0, C15 :0, C17 :0 et C 18 :0 et C22 :0. En effet, d'après Kaneda (1967) et Perry *et al.* (1979), la forte abondance de l'acide stéarique (C18:0) dans les phospholipides de certains bivalves inspire une fonction essentiellement de type structurale. L'acide myristique a également un rôle fonctionnel majeur pour la cellule : il acyle (myristoylation) un nombre important de protéines et leur permettent ainsi d'exercer leur rôle dans la cellule (Le grand, 2007).

Le taux élevé de l'acide palmitique C16 :0 dans la nacre en tant que substitut osseux s'avère importante puisque selon Gille (2011) les résultats d'une étude cytologique qui a cherché à déceler un effet potentiellement inhibiteur ou stimulant de divers acides gras sur la production des ostéoclastes et des ostéoblastes. Dans l'essai cytologique, c'étaient principalement les acides gras saturés à longueur de chaîne de C14 à C18 qui inhibaient la formation des ostéoclastes, en même temps qu'ils stimulaient la croissance et la multiplication des ostéoblastes. L'auteur a constaté à cette occasion que l'acide palmitique (C16), autrement dit l'acide gras le plus abondant dans le lait, développait l'effet le plus prononcé. Certains acides gras mono et poly insaturés avaient l'effet contraire: ils stimulaient la multiplication des ostéoclastes et freinaient la formation des ostéoblastes. Si ces observations se confirment chez l'être humain, une nouvelle voie hautement intéressante s'ouvrirait pour le traitement des maladies osseuses et la prévention de l'ostéoporose.

Les *Pinctada radiata* sont des organismes polytrophiques. Ils tirent les nutriments de différentes sources trophiques dont phyto-et zooplancton.

Le régime alimentaire est une source importante d'acides gras polyinsaturés pour les invertébrés. Pour cette espèce il est possible que la source de lipides importante soit de organismes tels que les dinoflagellés.

Les investigations des microalgues au ^{14}C ont montré que le phytoplancton a contribué un maximum de 26% pour le quotidien de demande en carbone organique de *Dendronephthya sp.* (Widdig et Schlichter, 2001).

La faible contribution trophique par les herbivores. La teneur élevée en lipides chez *Pinctada radiata* est similaire ou concorde avec celle de *Pinctada margaritifera* à Takapoto. Chez les différents constituants de la matière organique à Takapoto sont à peu près également distribués avec environ 1/3 pour chacun des lipides protéines et glycogènes et par conséquent une teneur en lipides particulièrement élevée en pouvant comparant même le milieu méditerranéen oligotrophe à capacité biotique peu importante à Tokapoto.

Parache et Masse (1987) donnent une teneur en lipide équivalente dans la zone de Carreau en soulignant son caractère exceptionnel. Ainsi elle ne dépasse pas 10% à Marennes (Heral *et al.*, 1980) Il est intéressant de noter que Parache et Masse rattachent cette forte teneur en lipides à l'abondance des dinoflagellés riches en acides gras essentiels (Folak, 1986). Or Sournia et Ricard (1976) donnent les dinoflagellés comme largement majoritaires à Takapoto. Les acides gras sont une source importante d'énergie durant le développement embryonnaire, larvaire et postlarvaire chez les mollusques et permettent aussi la survie pendant les périodes de faible disponibilité de la nourriture (Fiz *et al.*, 2011).

Le transfert de certains acides gras polyinsaturés des sources nutritifs marines des coraux sont supposée intervenir à la construction ou croissance du corail (Papina *et al.*, 2003). Ainsi ces AGPI participent bien pour la croissance de l'espèce *Pinctada radiata* et particulièrement de sa couche de nacre puisque la taille moyenne initiale des pinctadines était de 11,49 mm au mois de Novembre pour atteindre 43,55 mm pendant le mois d'Aout. *Pinctada radiata* est remarquable par sa pousse estivale très importante. Le taux de croissance de l'huître perlière *Pinctada imbricata* suit la même évolution que celle de *P.radiata*. En effet, l'intervalle de température 18-26° favorise son développement optimum. Ce qui explique la teneur élevée des AGPI pendant la période estivale et automnale.

Les résultats montrent également la présence des acides gras C22:2i et C22:2j. Les rôles biologiques des C22:2 (C22:2i et C22:2j) ne sont pas bien élucidés. En revanche, l'incorporation préférentielle des ces acides gras dans les lipides polaires et leurs distributions sélectives dans les tissus et les organes exposés à l'environnement extérieur, suggèrent un rôle structurel et fonctionnel dans les membranes biologiques (Tunncliffe *et al.*, 1998 ; Pirini

et al., 2007). D'après plusieurs auteurs, ces acides gras sont impliqués dans les mécanismes de la fluidité, de l'intégrité et de la structuration de la membrane (Irazu *et al.*, 1984 ; Kraffe *et al.*, 2004 ; Barnathan, 2009). D'après Barnathan (2009), le modèle d'insaturation inhabituelle de ces acides gras confère à la membrane cellulaire une résistance aux processus oxydatifs et lipases microbiennes. Ainsi la biosynthèse de ces acides gras peut représenter une caractéristique biochimique adaptative des organismes benthiques à leur habitat.

La composition en acides gras spécifique peut être une possible raison de cette distinction de la nacre en tant que substance ostéogénique, et a été distinguée par un taux élevé de plusieurs acides n-3, à savoir 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6 n-3, 18:3 n-3, 18:4 n-3 et le 20:4 n-3. Ces acides sont considérés comme des étapes interdépendantes de la voie biosynthèse bien connue des acides de la série n-3, par conséquent, il est très probable qu'il existe une cause mutuelle pour une augmentation simultanée de l'élévation de ces AG. La présence de nourriture avec un haut niveau de C20-22 AGPI n-3 série peut être une raison possible pour la composition en AG distinctifs découverts dans la nacre, entre autres par le DHA et L'ARA.

Les acides de la série n-3 l'emportent : contrairement à celui trouvé par Andrey, (2007) le taux de la série n-6 est plus élevé. Donc nous pouvons dire que la nacre figure le substitut osseux plus riche en n-3 par sa composition en AGPI que les coraux. La valeur moyenne du rapport n-3 est plus élevée à n-6 avantage l'os. Dans ce contexte, un nombre croissant de publications a permis de mettre en évidence que les acides gras de la famille des ω -6 étaient associés à une perte osseuse accrue, tandis que les ω -3 sont pressentis pour protéger le capital osseux (Ono *et al.*, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2009; Corwin, 2003; Calder, 2006). Néanmoins, ce débat reste controversé et les mécanismes d'action sont mal connus (Ben Ammar ; 2014).

Malheureusement, jusqu'à présent aucune donnée n'a encore été publiée sur la composition en AG de la nacre. La comparaison de la composition en acides gras a montré la présence d'un certain nombre de différences significatives entre les compositions AGPI entre les saisons, de 23,37 à 33,38% durant toute l'année ainsi ces derniers sont plus élevés en été et en automne.

Généralement, seul les microalgues peuvent synthétiser C20-22 AG polyinsaturés (AGPI) de la série n-6 et n-3. La capacité des invertébrés marins pour produire C18 (AGPI) qui sont les principaux précurseurs dans la biosynthèse C20-22 (AGPI), sont limités

Ces acides gras polyinsaturés sont essentiels pour les animaux et devrait être transféré à partir d'algues symbiotes (Dalsgaard *et al.*, 2003).

La présence de cette quantité de nourriture spécialement les dinoflagellés devrait sensiblement influencer sur la composition totale FA, parce que le profil en AG des organismes photoautotrophes diffère bien du profil en AG de l'animal consommateur (Papina *et al.*, 2003) l'EPA et DHA sont considérés comme comme marqueurs de dinoflagellés (Graeve *et al.*, 1994; Zhukova et Aizdaicher, 1995

Comparant avec la coquille Saint Jacques (*Argopecten purpuratus*) au Chili, Caers *et al.*, (1999) montre que le rapport n-3/n-6 de sa chair est égale à 12. Dans le présent travail, le rapport n-3/n-6 varie de 6,28 à 29,56 durant toute l'année avec la portion la plus élevée pendant la saison automnale ceci se traduit par une richesse de la série n-3 sur celle de n-6 Le rapport n-3/n-6 est un indice permettant d'évaluer la qualité nutritionnelle des produits de la mer et en particulier des Bivalves (Orban *et al.*, 2004). Plus la valeur de ce rapport est élevée plus la qualité nutritionnelle est meilleure.

Les phospholipides (PL) sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique, lui-même lié à un alcool aminé (choline, éthanolamine...). Ces phospholipides sont des lipides de structure car ils sont constituants des membranes cellulaires et en assurent entre autres la fluidité (Le Grand, 2007). Comme nous l'avons déjà mentionné, les PE et le PC sont majoritaires par rapport aux autres glycérophospholipides (PI et PS). Ceci est également vrai pour plusieurs autres bivalves marins.

Les résultats de l'ACP de la variation de la composition en acides gras des PC de la nacre de *P. radiata* au niveau de Maharès nous élucident le suivi saisonnier des PC qui varient de 21,88 à 30,99% et sont caractérisés par la richesse en AGMI en hiver et par une richesse en AGPI de la série n-3 et n-6 coïncidant à la saison d'automne. Ces AGPI sont plus riche dans la PC comme l'ont montré Morais *et al.* (2003), les AGPI se trouvent généralement en grandes quantités dans les phospholipides.

La PC constitue la catégorie lipidique dominante des phospholipides chez les bivalves d'une part, et d'autre part, elle est considérée comme étant la fraction lipidique la plus impliquée dans la régulation de la perméabilité et la structuration des membranes (Hall *et al.*, 2002 ; Delaporte *et al.*, 2005 ; Zhukova, 2007).

Les PE de 19,12 à 34,39 % suivent les mêmes variations que les PC avec une augmentation des EPA, DHA, DPA et ARA en automne. Les acides gras oméga 3 constituent une famille dont le premier élément est l'acide alphalinalénique indispensable (ALA, 18:3 oméga-3).

Les autres éléments, élaborés à partir de l'ALA, sont constitués de chaînes carbonées plus longues et plus insaturées. Les principaux AGPI n-3 étant l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20:5n-3) et le DHA (acide docosahexaénoïque, C22:6n-3) (Bourre, 2004). L'EPA et DHA possèdent un rôle crucial dans la nutrition et la santé humaine. En effet, ils sont impliqués dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires (Hu & Willett, 2002 ; Harris & Von Schacky, 2004), possèdent des propriétés anti-inflammatoires et immunitaires (Calder & Grimble, 2002 ; Gil, 2002 ; Simopoulos, 2002) et jouent un rôle inhibiteur dans le développement de certains cancers tels que le cancer du sein, du colon et de la prostate (Leitzmann *et al.*, 2004 ; Roynette *et al.*, 2004 ; Binukumar & Mathew, 2005 ; Moyad, 2005 ; Judé *et al.*, 2006), les PI faible en printemps 16,57 % et peut attendre jusqu'à 25,31% en automne. Le taux élevé des n-3 et n-6 en automne et hiver par contre les PS varient durant toute l'année et peuvent aller jusqu'à 38%.

Les PS sélectionnent positivement EPA et ARA en saison estival et hivernal et sélectionnent négativement DHA et DPA en automne et printemps (Fig.83). DPA peut jouer un rôle fonctionnel homologue de DHA dans les phospholipides avec des effets possibles sur la fonction de la protéine transmembranaire (Pernet *et al.*, 2005). L'acide gras 22:5n-3 a été incorporée dans de la phosphatidylcholine de manière sélective. Des auteurs ont suggéré une origine endogène pour 22:5n-3, biosynthétisée par élongation de l'EPA, (Watanabe *et al.*, 1989). Ce processus d'élongation pourrait contribuer à la rectification de la carence alimentaire en DHA avec un acide gras ayant la structure la plus proche (Soudant *et al.*, 1997).

Hall *et al.* (2002). En effet, il est admis que l'acide arachidonique (C20:4n-6) et l'acide eicosapentaénoïque (C20:5n-3) sont impliqués dans la biosynthèse des prostaglandines sous l'action de la cyclo-oxygénase chez les invertébrés (Stanley & Howard, 1998).

Le C20:4n-6 est à l'origine de la prostaglandine de la série 2 (PGE2) tandis que le C20:5n-3 donne la prostaglandine de la série 3 (PGE3).

les lipides polaires sont majoritairement dominés par les phosphatidylcholines (PC). Cette catégorie constitue plus que 30% des phospholipides.

La PS et la PE constituent des amino-phospholipides principalement localisés dans la couche interne de la membrane et sont particulièrement impliqués dans la fluidité membranaire et l'activité des protéines membranaires liées (Kraffe *et al.*, 2004 ; Delaporte *et al.*, 2005).

Lesquelles protéines membranaires possèdent des activités enzymatiques, ont des fonctions structurales et constituent des moteurs moléculaires (Stevens & Arkin, 2000) (Fig. 84 et 85).

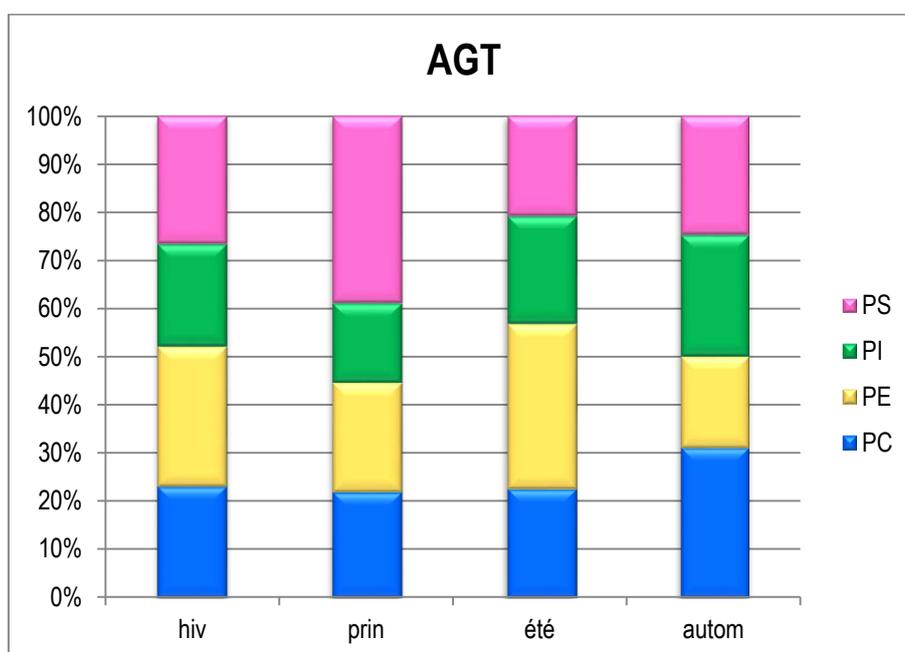


Figure. 83 Variations des teneurs (%) des acides gras totaux des différentes catégories lipidiques de la nacre de *P. radiata* en fonction des saisons

PC : Phosphatidylcholines ; PS : Phosphatidylsérines ; PE : Phosphatidyléthanolamines ; PI : Phosphatidylinositols.

Les lipides membranaires sont distribués d'une façon asymétrique entre les deux faces de la bicouche. Certains lipides ne se retrouvent que dans la face externe de la bicouche alors que d'autres existent dans la face interne (Fig. 84)

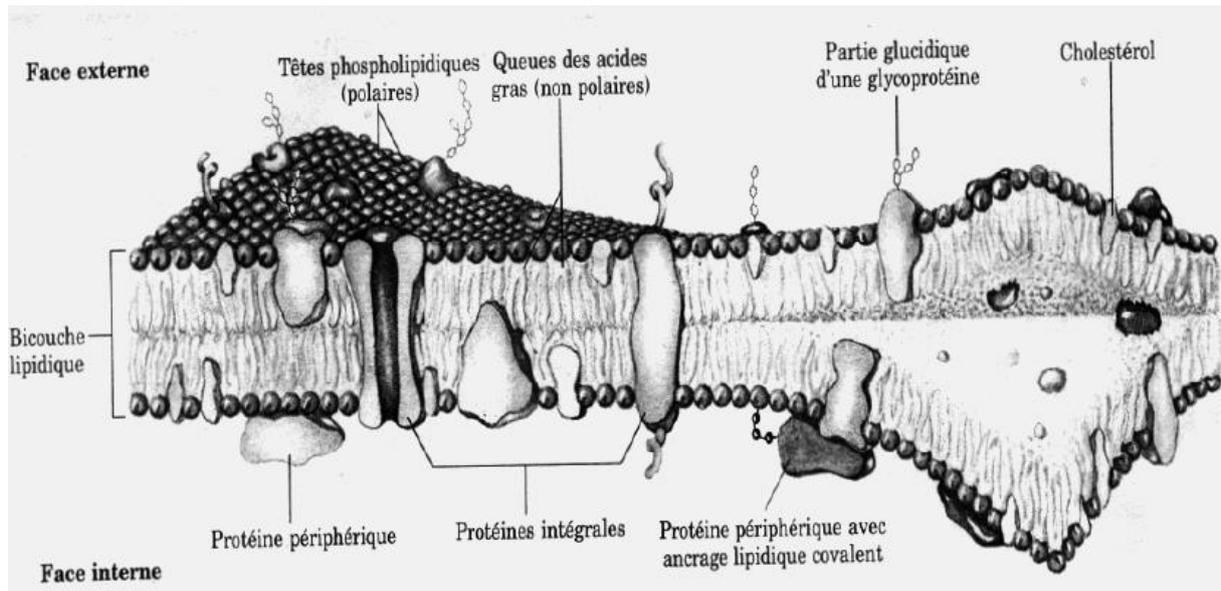


Figure. 84 Le modèle de la mosaïque fluide de la structure membranaire

(Lehninger et al.,1994).

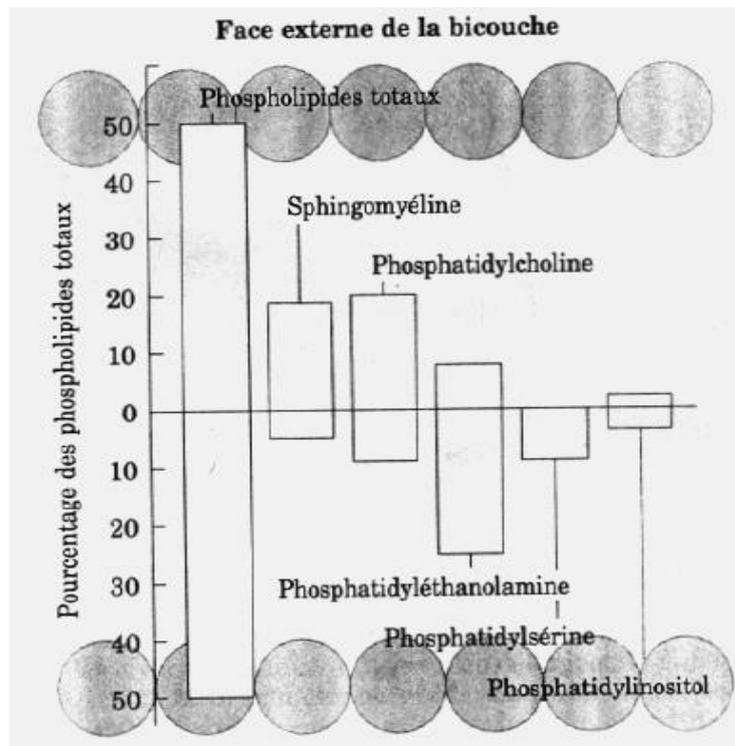


Figure. 85 La distribution des lipides de la membrane érythrocytaire entre les faces interne et externe (Lehninger et al.,1994).

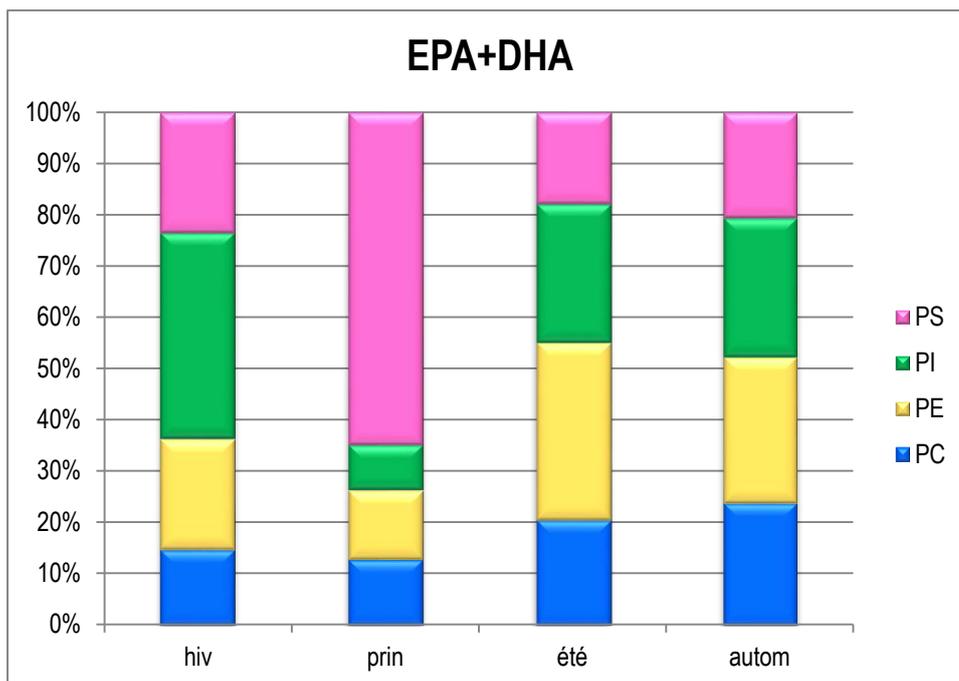


Figure .86 Variations des teneurs (%) des EPA+DHA des différentes catégories lipidiques de la nacre de *P. radiata* en fonction des saisons

PC : Phosphatidylcholines ; PS : Phosphatidylsérines ; PE : Phosphatidyléthanolamines ; PI : Phosphatidylinositols.

EPA a diminué dans les lipides polaires tandis que le DHA a augmenté, ce qui suggère une utilisation sélective des EPA peut être utilisé comme combustible pour le développement et / ou peut être lié à la production d'eicosanoïdes en raison de son rôle de précurseur de ce groupe d'hormones hautement biologiquement actif (Fiz *et al.*, 2011).

Les lipides et les acides gras jouent un rôle important dans le développement des invertébrés marine qui sont liés à la quantité de nourriture et qualité (Przeslawski *et al.*, 2008). EPA et DHA ont diminué dans les deux classes de lipides (PC et PE en hiver et en printemps (Fig. 86). Dans ce cas, l'EPA a montré un rôle énergétique et il n'y avait pas de conversion en DHA. ce qui suggère un rôle spécifique pour cet acide gras dans les membranes cellulaires.

Dans l'ensemble, les nouvelles données sur la composition en acides gras qui ont été pour la première fois obtenu pour la nacre pourraient être importantes pour des futures enquêtes sur l'ostéogénie, le métabolisme des lipides, marqueurs trophiques, et dans les études chimiotaxonomiques de la nacre de *Pinctada radiata*.

Chapitre III

Variations saisonnières et comparaison de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair et de la nacre de *Pinctada radiata* dans la zone de Maharès

A. Introduction

La composition en acides gras des phospholipides des organismes marins est souvent étudiée chez les poissons afin de valoriser leurs apports nutritionnels. Pour la détermination des lipides dans les espèces de bivalves, seules les huîtres, coquilles coquilles Saint-Jacques, et les moules ont été étudiées en détail (Saito, 2004, Soudant *et al.*, 1998 et Freitas *et al.*, 2002) encore moins existante concernant la nacre, couche interne de l'huître perlière *Pinctada radiata*. A notre connaissance Farre *et al.* (2009) a déjà caractérisé la composition en lipides polaires de l'enveloppe de couche nacrée de *Pinctada margaritifera*, sans préciser le profil des différents acides gras.

En portant notre intérêt sur l'ostéogénie de la nacre de l'espèce *P. radiata* en tant que potentiel de substitution osseuse nous avons vu essentiel d'étudier en parallèle la composition des acides gras de sa chair de comparer les profils saisonniers et voir leur relation dans le but de compléter si nécessaire avec les acides gras de la chair en culture cellulaire et d'essayer de comprendre la composition saisonnière en acides gras de la chair et de la nacre en comparant ses deux profils. A notre connaissance, les informations concernant la composition en acides gras chez *P. radiata* sont très peu présentes dans le monde et absentes sur les côtes de la Tunisie.

Cependant, les contenus en acides gras récupérés des différents phospholipides membranaires pouvant résulter de l'alimentation effectués par cette espèce. Nous avons vu nécessaire et pour clarifier et comprendre cette composition. L'analyse de la composition en acides gras des différents glycérophosphates (PC, PE, PI et PS) ne serait pas appropriée sans faire l'étude du contenu des lipides polaires surtout durant l'année. Une étude de cette composition a été faite au cours de la saison hivernal (Ben Ammar ; 2012 et 2014) qui s'avérait la saison la plus riche en acides gras polyinsaturés correspondant à une saison d'intense activité trophique se traduisant par une forte teneur en AGT, cette teneur serait mobilisée en vue de la maturation des œufs chez *Pinctada radiata*. On peut assumer que la période de ponte débiterait au printemps et se prolongerait à la fin de l'été. Ces résultats corroboreraient les observations de Tlig Zouari (1994).

Le profil des acides gras de la chair et de la nacre était le même qualitativement mais diffère quantitativement. En conséquence, notre première hypothèse de travail était que les lipides de la chair proviendraient essentiellement des ressources alimentaires présentes ce taux dépend des conditions comme la température, la qualité nutritionnelle, la reproduction, la période de ponte, la croissance etc.

Notre deuxième hypothèse c'est que la composition en acides gras de la nacre provient de l'alimentation des particules en suspension des dinoflagellés, etc...aussi et donc de la chair de l'espèce et dépend aussi de la croissance et des mêmes conditions de la coquille entière.

Les principaux objectifs de ce chapitre étaient donc :

- De comparer la composition lipidique particulièrement les phospholipides de la chair durant l'année afin d'observer s'il existait un remaniement de ce contenu suivant les saisons
- De comparer ces profils lipidiques avec ceux de la nacre biomatériau potentiel afin de déterminer les liens,
- De rapprocher ces résultats avec les compositions spécifiques des contenus en lipides sur le pouvoir ostéogénique de la nacre et en cas d'un déficit qui sera compensé par le contenu de la chair.

B. Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair et de la nacre de *Pinctada radiata* dans la zone de Maharès

B.I. Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de *Pinctada radiata*

B.I.1. Analyse des résultats

Nous avons étudié les variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair *P. radiata* récoltés durant la première campagne de pêche (2011-2012) à Maharès au niveau de la région sud-est tunisienne afin de fournir des informations sur la qualité des lipides polaires de cette espèce.

Les résultats de l'analyse des acides gras présentés dans l'annexe (9) ont révélé durant un cycle saisonnier, le contenu des acides gras insaturés variaient autour d'une valeur moyenne de 35,32 et 51,42 % des lipides polaires ce qui correspond à environ 30 % des lipides totaux. La majorité de ce contenu est présentée par la dominance des AGPI (27,65-44,77%) avec des valeurs élevées respectivement enregistrés en hiver et en automne (44,77 et 41,85%), également pour les acides gras de la série n-3 qui sont majoritaires par rapport à la série n-6 et sont surtout composés des EPA+DHA, ces derniers sont composés de 29,72 ; 15,44 ; 13,30 et 16,83 de la saison hivernale à l'automnale. Le taux le plus élevé est enregistré en hiver.

B.I.2. Analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) de la variation de la composition en acides gras totaux de la nacre de *P. radiata* au niveau de Maharès en fonction des saisons (Fig.87et 88, Tab. XXII)

Cette analyse nous a permis de retenir les deux premiers axes qui contribuent ensemble par 44,63% à la variance totale.

Le premier axe contribue à lui seul par 25,79 % alors que le deuxième ne contribue que par 18,84 % selon le plan factoriel (1 × 2).

Cette représentation montre que l'axe F1 est clairement lié aux acides gras essentiels (EPA, AA et DHA) C20 :5n-3, C20:4n-6 et C22 :6n-3, ainsi que C18:3n-4, C18:2n-6, alors que l'axe F2 est plutôt lié aux acides gras saturés et monoinsaturés C14 :0, C17 :0, C16 :0, C14 :1, C15 :1 C16 :1 en les sélectionnant négativement correspondant à la saison du printemps selon le plan de la projection des individus.

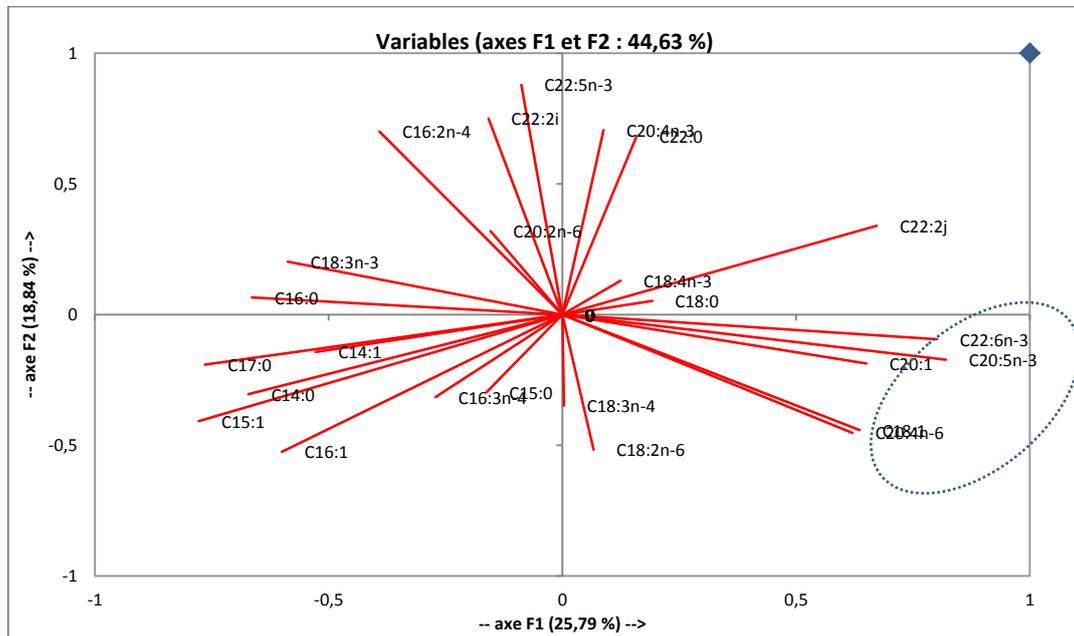
Suivant le plan factoriel (1 × 3) (Fig.88), l'axe factoriel F1 absorbe par 25,79 % et l'axe factoriel F3 absorbe 14 % de la variance totale, le cumul autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbent 84,42 % de la variance totale.

Selon le plan factoriel (1×3), l'axe F1 sélectionne positivement les acides gras essentiels de la série n-3 EPA, DHA et ARA ce qui coïncide avec la saison hivernale sur le plan de la projection des individus ces résultats confirment les résultats précédent présentés sur le plan factoriel (1×2). l'axe F3 est lié principalement aux différents acides gras saturés et monoinsaturés correspondant à la saison d'été et celle du printemps.

Tableau XXII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Chair (LP).

Chair (LP)	F1	F2	F3
Valeur propre	6,447	4,711	3,500
Cumuls de la variance expliquée (%)	25,789	44,633	58,631

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

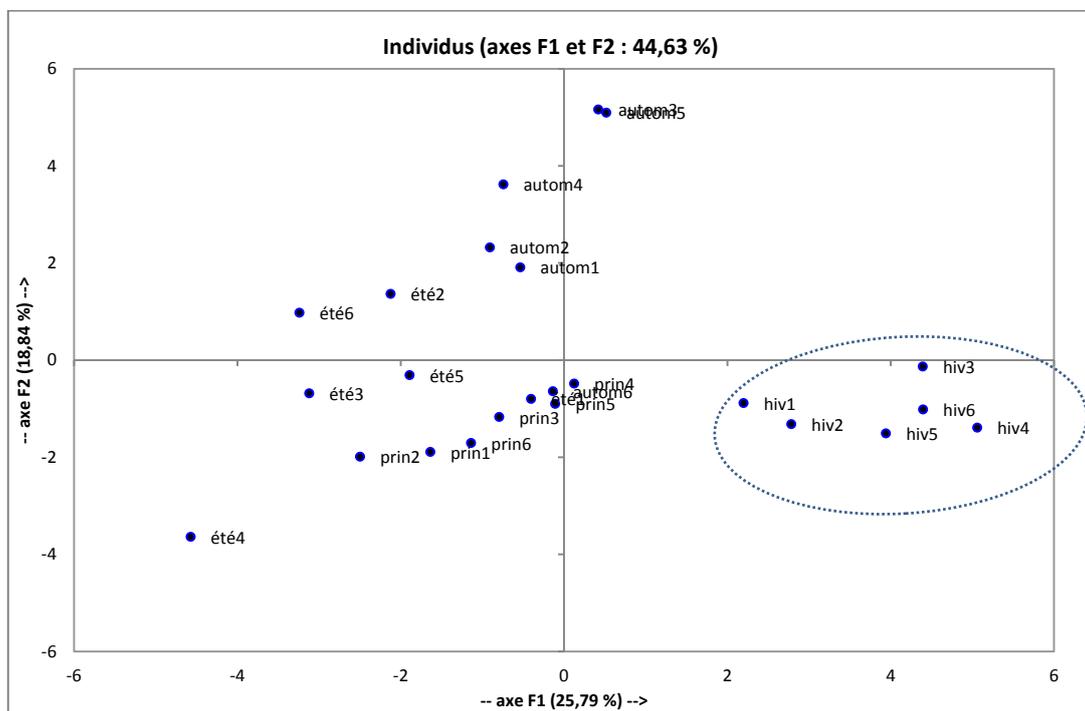
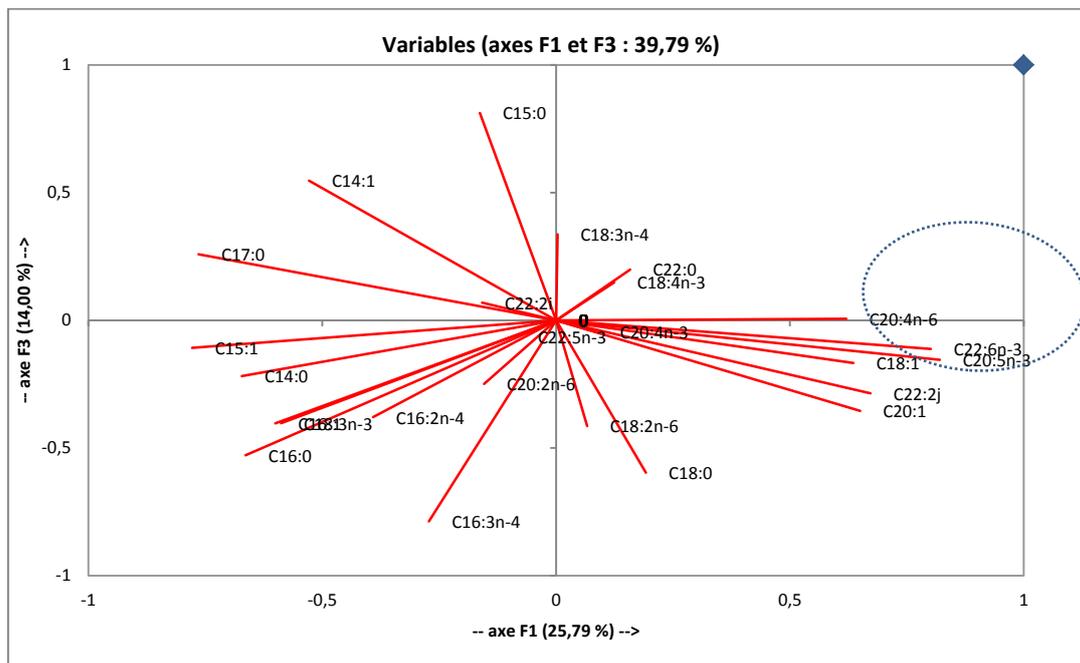


Figure.87 Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

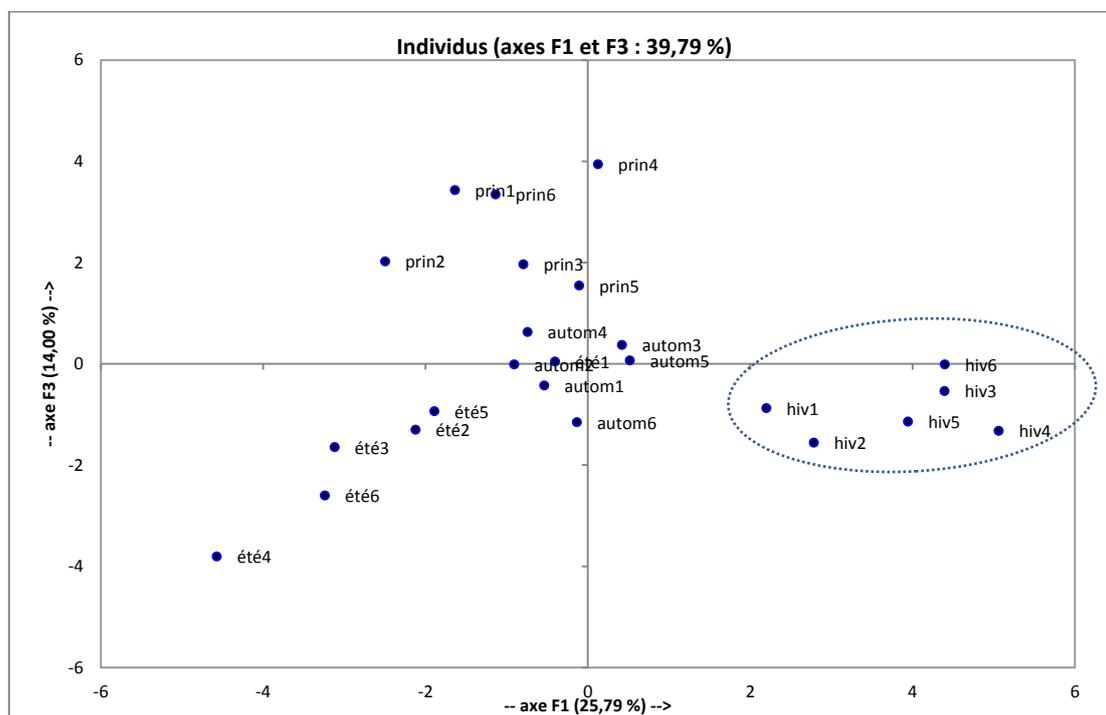


Figure.88. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

B.II.Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de *Pinctada radiata*

B.II.1. Analyse des résultats

Les variations saisonnières des acides gras des lipides polaires sont présentées dans l'annexe (10). Les valeurs les plus élevée d'AGPI ont été enregistrées en hiver-automne (26,55 - 29,65%) et la plus faibles en été et au printemps respectivement (18,62 et 21,28%). Le pourcentage des AGS riche principalement en C16 :0 (de 22,92 à 37,82%) et C18 :0 (de 19,43 à 35,23%) allait de 59,94 en hiver et 72,21 mg/100g en printemps. Les acides gras polyinsaturés sont riche principalement des acides gras de la série n-3.

On a observé que la composition en acide gras de *P.radiata* variait tout au long des saisons. Les acides gras polyinsaturés de la série n-3 sont principalement composés des EPA, DPA (22:5n-3: acide docosapentaénoïque), C22:3n-3(acide docosatriénoïque) et DHA des différences significatives saisonnières ($P < 0.05$) ont été observées parmi les autres acides gras, les acides gras de la série n-3 atteignent leur maximum en automne et en printemps.

B.II.2.Analyse en composante principale (ACP)

Pour cette ACP, Vingt-cinq acides ont été considérés comme descripteurs des lipides polaires de ce biomatériau potentiel au niveau de Maharès en fonction des saisons : des AGS : C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0 et C22:0; des AGS :C14:1, C15:1, C16:1, C18:1, et C20:1 et des AGPI C18:2n-6, C20:2n-6, C20:4n-6, C18:3n-3, C18:4n-3, C20:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3, C16:2n-4, C16:3n-4, C18:3n-4, C22:2i et C22:2j.

Leurs représentations sur un plan F1 x F2 absorbent 39,85% de la variance totale (Fig .89, Tab. XXIII).

L'axe F1, absorbant 23,71% de la variance, sélectionne négativement C22 :6n-3,C22 :5n-3 et l'EPA qui coincide avec la saison printanière sur la projection des individus sur le plan factoriel (1×2) alors que l'axe factoriel 2 absorbant 16,14 % de la variance totale sélectionne négativement le groupe des acides gras essentiels distingué essentiellement par DHA, et sélectionne positivement surtout l'EPA et L'AA correspondant à la saison d'hiver selon la projection des individus sur le même plan. Ceci s'explique aussi selon le plan factoriel (1×3)

(Fig90, Tab XXIII). l'axe factoriel F3 sélectionne positivement le groupe des acides gras essentiels distingué essentiellement par DHA et DPA correspondant à la saison automnale sur la projection des individus selon le plan factoriel (1×3). L'axe factoriel F3, absorbant 11,55% de la variabilité avec l'axe F1, absorbant 23,71% absorbent 35,26% de la variance totale.

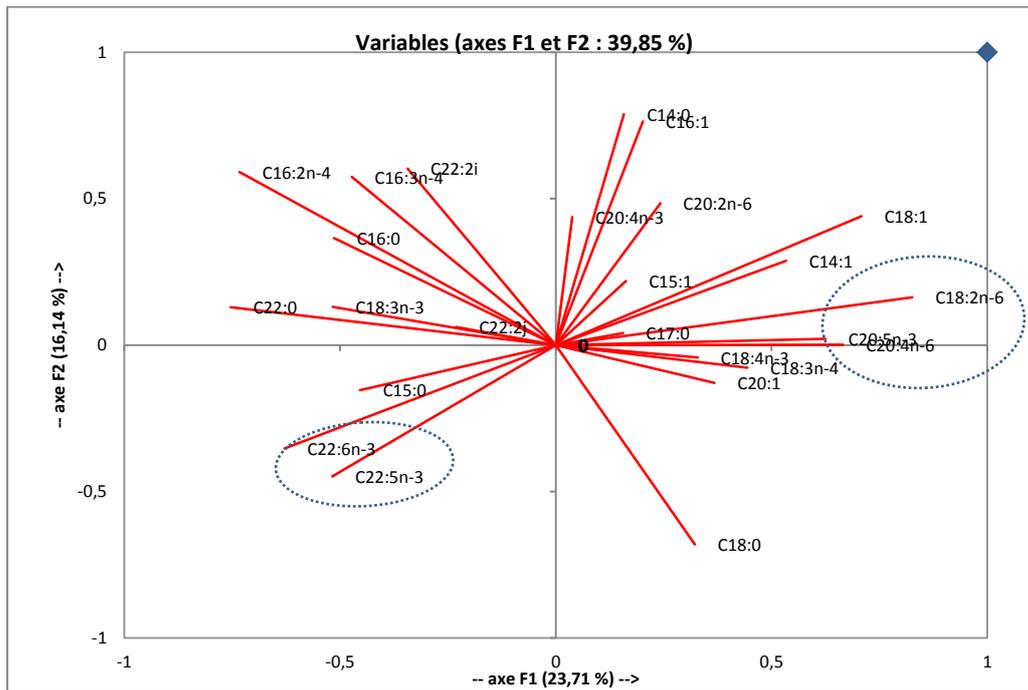
Sur l'axe factoriel 1 (23,71%), les variables qui représentent les plus fortes dispersions sont les acides gras saturés (C14 :0, C15 :0, C16 :0 et C :17 :0 ainsi que les acides gras monoinsaturés (C14 :1, C15 :1, C16 :0 et C20 :1), par contre, contribue le plus à la variabilité sur l'axe 3 (11,55%). La projection des individus (saisons) sur le plan factoriel (1 :3) ne révèle aucune contribution significative des saisons printanières et estivales sur les deux composantes principales.

A partir de cette association, nous pouvons déduire une forte corrélation positive sur la projection des individus que ce soit sur le plan F1 x F2 et F1 x F3. L'analyse en composante principale a permis la discrimination des différentes observations autour des trois axes F1, F2 et F3 absorbant 75,11 % de la variance totale.

Tableau XXIII. Pourcentage de contribution à la variance expliquée des principaux axes factoriels. Nacre (LP).

Nacre (LP)	F1	F2	F3
Valeur propre	5,928	4,035	2,888
Cumuls de la variance expliquée (%)	23,711	39,852	51,405

Projection des variables sur le plan factoriel (1×2).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 2)

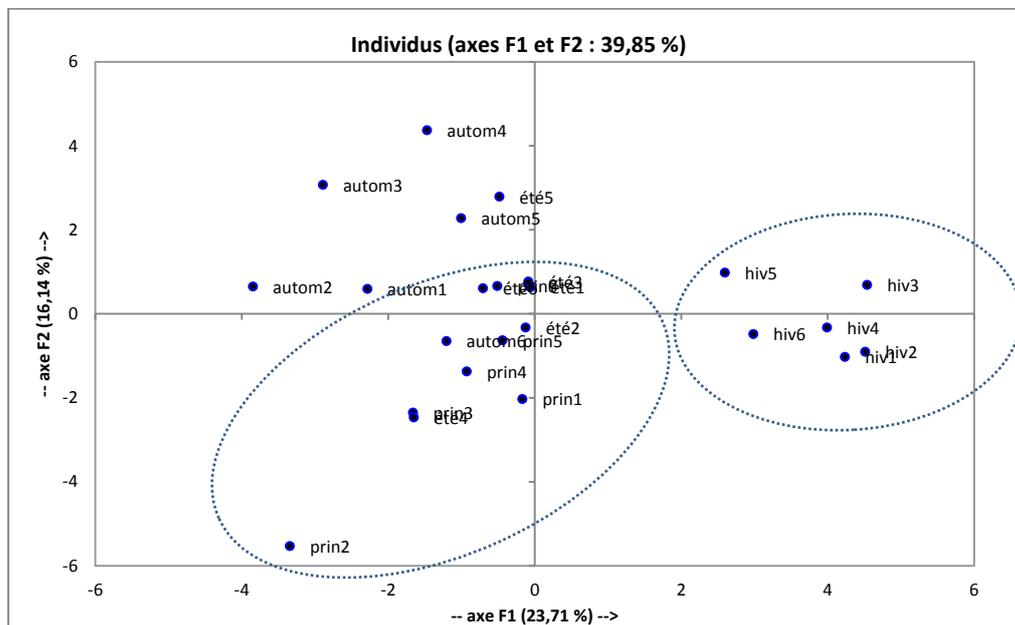
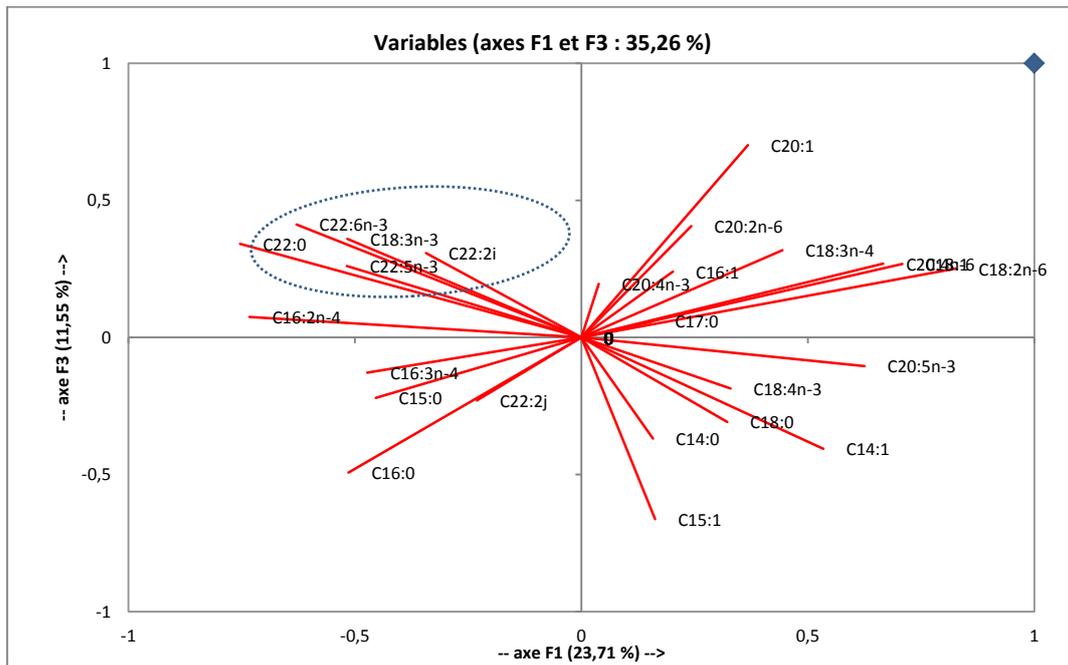


Figure.89. Analyse en composante principale (plan 1 :2) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

Projection des variables sur le plan factoriel (1 × 3).



Projection des individus sur le plan factoriel (1 × 3)

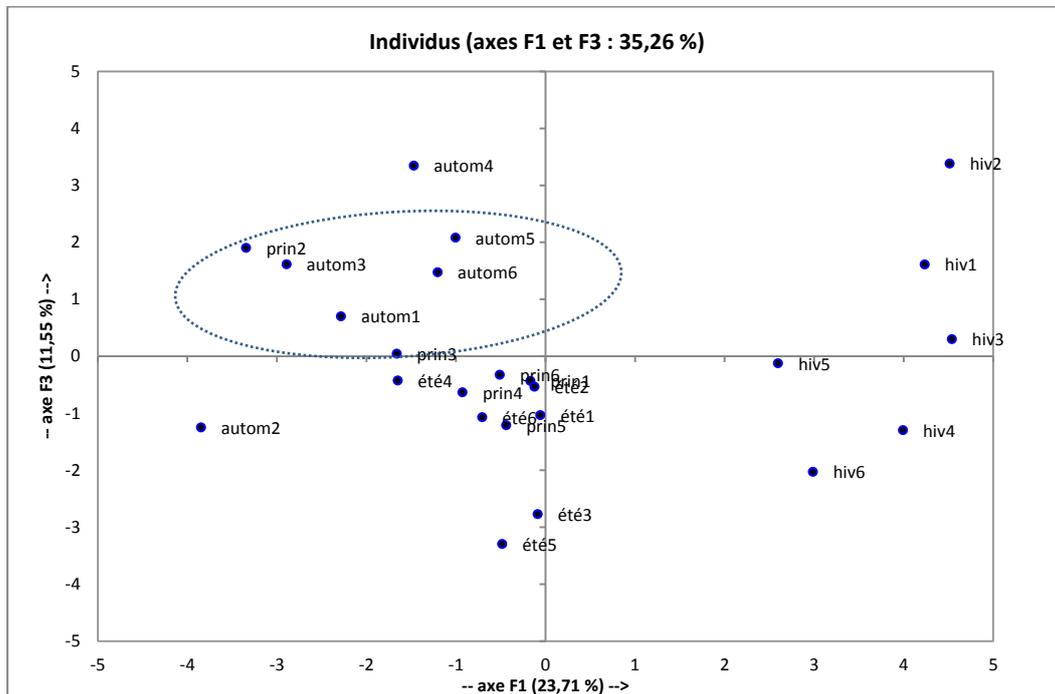


Figure. 90. Analyse en composante principale (plan 1 :3) de la variation de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de *Pinctada radiata* en fonction des saisons.

C. Discussions

Les lipides, et plus précisément les acides gras, font partie des divers éléments nutritifs qui servent d'indicateurs pour en évaluer la qualité nutritionnelle. Ainsi, de nombreux travaux ont été effectués pour caractériser la composition lipidique et en acides gras des organismes marins. Cependant, aucune étude visant à l'étude des acides gras spécialement en lipides polaires de ce mollusque invasif *P. radiata* et suivre les variations des pourcentages des différents groupes d'acides gras des lipides polaires au niveau de la chair et de la nacre de *P. radiata* en fonction des saisons nous avons donc choisi d'étudier les ressemblances ou dissemblances des profils des lipides polaires au niveau de la nacre et la chair. Cette comparaison a pour objectif d'un côté de confirmer les résultats trouvés dans le chapitre précédent mettant l'accent sur la composition des différents catégories lipidiques (PC, PE, PS et PI) de voir l'évolution saisonnière de cette composition et d'un autre côté puisque les phospholipides constituent les membranes cellulaires et vue leur rôle structurale au niveau de la cellule nous avons vu nécessaire de comparer les deux profils en vue de leur utilisation en culture cellulaire pour voir leurs effets ou leur pouvoir ostéogénique de combler la déficience de l'un des extraits par l'autre.

Le suivi saisonnier de l'évolution des lipides polaires de la chair montre le même profil des acides gras que celui de la nacre composés des acides gras suivants : saturés (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0 et C22:0; monoinsaturés: C14:1, C15:1, C16:1, C18:1 et C20:1 et polyinsaturés : C18:2n-6, C20:2n-6, C20:4n-6, C18:3n-3, C18:4n-3, C20:4n-3, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3, C16:2n-4, C16:3n-4, C18:3n-4, C22:2i et C22:2j(Ben Ammar, 2012 et 2014).

Les analyses montrent que les acides gras saturés sont prédominants dans la nacre que dans la chair (Annexe.10) et sont essentiellement composés de l'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide stéarique (C18 :0) et sont nettement élevés dans la nacre que dans la chair. C18 :0 est converti partiellement par désaturation en acides gras monoinsaturés comme synthèse endogène (Le Grand, 2002). Cet acide gras est élevée dans la saison printanière contrairement à la chair son taux baisse dans la même saison. Cette richesse de la nacre en acides gras saturés peut être due à leurs utilisations dans la croissance de la couche de nacre qui se déroule surtout dans les saisons à température élevés. Selon Freitas *et al.*, (2002) ces acides

gras sont probablement liée à plusieurs paramètres, dont la richesse de l'environnement par les détritiques organiques qui sont une source importante de C14: 0, C15: 0, C16: 0 et C18: 0.

Chez cette espèce nous avons noté une diminution du pourcentage des AGMI contre une élévation des AGPI. Cependant, l'alimentation de ce bivalve semble affecter plutôt les lipides polaires. En effet, dans la nacre et la chair une élévation significative des AGMI a été notée contre une diminution des AGPI et des AGPI (n-3). Quant aux AGPI (n-6), leurs pourcentages ont demeuré invariables et suivent la même variation saisonnière dans la chair et la nacre.

Les acides gras polyinsaturés des lipides polaires sont prédominants dans la chair, ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans d'autres bivalves comme *Flexopecten Glaber* (Pectinidae) (Telahigue *et al.*, 2010), oyster *Crassostrea gigas* (Dridi *et al.*, 2008) et *Pinctada fucata martensii* (Saito., 2004). Ces AGPI de la chair présentent presque le double que ceux présentés dans la nacre (figure (A) et (B)). Selon Palacios *et al.*, 2005 ce taux est élevé à cause de la transformation de la SFA à l'UFA (poly et mono) qui est plus grande dans la chair où se produisent différents métabolismes comme la reproduction.

Les AGPI de la nacre ne suivent pas la même variation saisonnière que la chair sont élevés en automne et baissent en été par contre élevés en hiver et baissent en printemps dans la chair. Ceci pourrait être due qu'en dehors de la période de la ponte les réserves énergétiques (en lipides) sont mobilisées pour assurer la survie du bivalve d'une part et le développement de la couche nacrée et de la coquille d'autre part. Puisque cette espèce a une activité sexuelle continue (Tlig et Zouari, 1994) ceci souligne l'importance des phénomènes de maturation de cette espèce également due à son activité se traduisant comme par exemple chez *Pinctada margaritifera* par l'alternance ouverture fermeture de sa coquille avec différents types de mouvements qui reflètent l'activité physiologique (filtration, respiration, excrétion, ponte) et son comportement alimentaire (Fig. 91) selon une étude de sa physiologie menée par (Robert *et al.*, 1995).

Ainsi l'huître peut utiliser beaucoup de ses réserves énergétiques de ses acides gras en période estivale et automnale pour la croissance ainsi de la croissance de la coquille. Les teneurs importantes des lipides au niveau de la chair sont vraisemblablement dues à un transfert de ces métabolites vers la coquille pour maintenir sa croissance et son développement.

Gabbot, (1975) et Tocher et Sargent, (1984) ont également conclu que les phospholipides jouent principalement un rôle structural dans les membranes biologiques, mais peuvent aussi être stockées en grandes quantités comme une réserve de lipides dans les œufs des organismes marins.

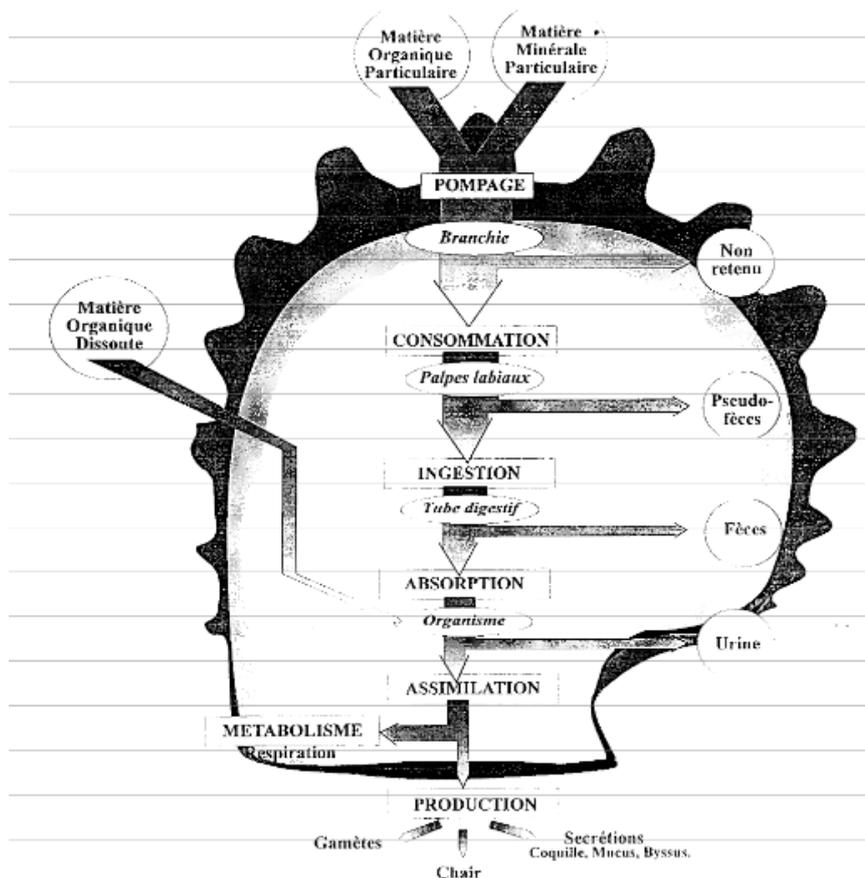


Figure 91. Comportement nutritionnel de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (Robert *et al.* ; 1995).

Dans la nacre le suivi saisonnier de l'évolution des LP ne montre pas de variation significative ($p > 0,05$) des pourcentages d'AGPI. Ces variations très mineures seraient dues au fait que les phospholipides, desservent principalement les fonctions de type structural (Swift, 1977 ; Pazos *et al.*, 1997a).

Les AGPI de la série n-3 suivent la même variation saisonnière que les acides gras polyinsaturés au niveau de la nacre qu'au niveau de la chair de *P. radiata*. En effet, ces derniers confèrent à ces organismes un bon développement larvaire (Robenson *et al.*, 1981 ;

Thompson & Harrison, 1992 ; Soudant *et al.*, 1996 ; Le Pennec *et al.*, 1998 ; Jonsson *et al.*, 1999). Plusieurs auteurs ont attribué ces pourcentages élevés en AGPI à un apport direct par l'alimentation composée majoritairement de Diatomées et de Dinoflagellés (Pollero *et al.*, 1979 ; Trider & Castell, 1980 ; Napolitano *et al.*, 1992 ; Robinson, 1992) ou indirectement par un transfert à partir de la glande digestive et/ou d'autres tissus de réserve (Barber & Blake, 1985 ; Pazos *et al.*, 1997 ; Le Pennec *et al.*, 2001 ; Darriba *et al.*, 2005).

Nous avons enregistré l'existence des acides gras C22:2i et C22:2j dans La chair et la nacre de *P.radiata* Selon Maryse (2005), ces acides gras sont présents dans les lipides polaires de *Crassostrea gigas* et *Ruditapes philippinarum*. Ces acides gras (C22: C22: 2i et 2j) sont impliqués dans les mécanismes de la fluidité, de l'intégrité et de la structure de la membrane (Gilles,2009). La présence de ces acides gras bivalve confère une protection contre les altérations de la membrane en raison de changements dans l'environnement physico-chimique.

Les AGPI de la série n-6 sont composés principalement des C20 :4n-6 (AA) et C18 :2n-6 (ALA) ces derniers suivent la même variation saisonnières dans la nacre et la chair et ont surtout un taux élevé qui coïncide avec la saison d'hiver (figure 92) le taux élevée de ALA peut être due à sa conversion en DHA (Alessandri *et al.*, 2008).

Les AGPI n-3 modulent le métabolisme énergétique à plusieurs niveaux : le transport du glucose (Pifferi *et al.*, 2005 ; Hichami *et al.*, 2007), la glycolyse (Kothapalli *et al.*, 2007), la phosphorylation oxydative (Ximenes *et al.*, 2002 ; Kitajka *et al.*, 2002, Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003 ; Kitajka *et al.*, 2004) et l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase (Bersohn et Spitz, 1974 ; Bourre *et al.*, 1989). Ainsi les AGPI sont composés essentiellement des EPA et DHA selon la variation saisonnières de ces acides gras essentiels nous avons remarqué dans la chair et la nacre que l' EPA a diminué dans les lipides polaires tandis que le DHA a augmenté, (Fig. 92 (A) et (B)), ce qui suggère une utilisation sélective des EPA peut être utilisé comme combustible pour le développement et / ou peut être lié à la production d'eicosanoïdes en raison de son rôle de précurseur de ce groupe d'hormones hautement biologiquement actif selon (Fiz *et al.*, 2011).

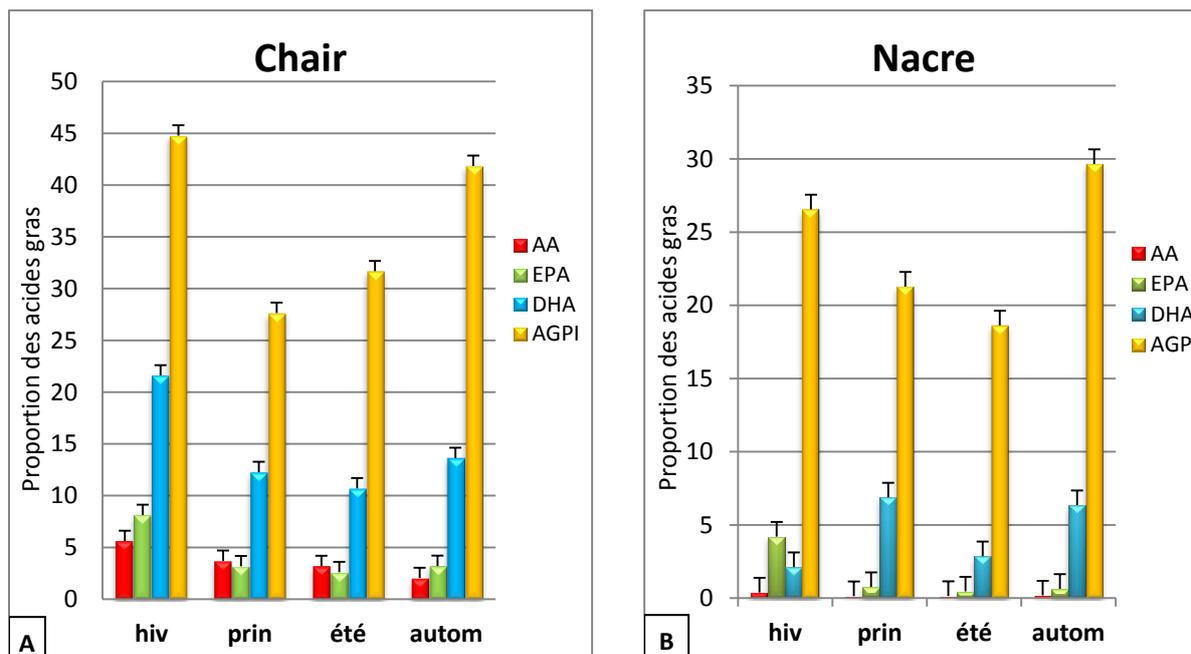


Figure.92 (A) Proportion relative de quelques acides gras essentiels (AA, EPA et DHA) et acides gras polyinsaturés de la fraction des lipides polaires de la chair de *P. radiata*.

(B) Proportion relative de quelques acides gras essentiels (AA, EPA et DHA) et acides gras polyinsaturés de la fraction des lipides polaires de la nacre de *P. radiata*.

L'intérêt nutritionnel des AGPI et notamment des dérivés à longue chaîne de la série n-3 a fait l'objet d'un grand nombre d'investigations sur la prévention et la thérapie de certaines pathologies du système nerveux central (Astorg *et al.*, 2006 ; Calder et Yaqoob, 2009).

L'acide linoléique, l'AA et le DHA sont les principaux AGPI constituants des phospholipides membranaires. Ils modulent l'action de différents acteurs de la signalisation inter- et intracellulaire (enzymes, transporteurs, récepteurs, canaux ioniques). Ils interviennent de façon directe en constituant un microenvironnement peu ordonné et flexible, facilitant ainsi les changements de conformation nécessaire à l'activité de protéines intrinsèques, ou indirectement en induisant la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés, enrichis en acides gras saturés, en phosphatidylcholine, en glycosphingolipides et en cholestérol (les rafts) auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (Shaikh *et al.*, 2003, Wassall *et al.*, 2004). En effet, la faible affinité du cholestérol pour les phospholipides les plus riches en

DHA (phosphatidyléthanolamine) pourrait servir de mécanismes de sélection dans la formation des rafts.

Des études observationnelles et interventionnelles ont montré que des apports élevés en oméga 3 pourraient réduire le risque de présenter de nombreuses pathologies (coronaropathie, hypertension, diabète de type 2, polyarthrite rhumatoïde, maladies auto-immunes, cancer). A contrario, d'autres études ont montré qu'un régime trop riche en oméga 6 créait un contexte inflammatoire de nature à majorer ce risque. (Weiss *et al.*, 2005).

La chair de *P. radiata* est une meilleure source d'acides gras polyinsaturés de la série n-3 (Ben Ammar ; 2014). Ce résultat est semblable à ceux trouvés dans d'autres mollusques bivalves comme les pétoncles, *Jacques*, *Chlamys varia*, *varia Pecten Jacobaeus* (Katsanevakis, 2005) et des Pectinidés, *glaber Flexopecten* sur les côtes nord de la Tunisie qui ont des valeurs nutritionnelles intéressantes (Telahigue *et al.*, 2010) en raison de leurs niveaux relativement élevés d'acides gras polyinsaturés n-3, en particulier dans les EPA et DHA.

Les AGPI jouent un rôle important à plusieurs niveaux ainsi le rôle de médiateurs lipidiques se fait à travers ces derniers. Les AGPI à 20 atomes de carbone [acide dihomométhyloléique (DGLA, 20:3n-6) ; AA et EPA] conduisent, par leur entrée dans des voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation ou de peroxydation, à la formation de puissants médiateurs de la signalisation cellulaire qui ciblent l'ensemble des tissus de l'organisme.

L'entrée des AGPI dans ces voies métaboliques requiert tout d'abord l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 des phospholipides membranaires sous l'action d'une phospholipase de type A2 (PLA2).

Les AGPI ainsi libérés peuvent emprunter deux voies métaboliques principales : la voie des cyclooxygénases générant les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes) ou la voie de la lipoxigénase conduisant à la synthèse des acides gras hydroperoxydés et hydroxylés puis aux leucotriènes (Guesnet *et al.*, 2005) (Fig.93).

Pour chaque famille de molécules, on distingue trois séries selon la nature de l'AGPI (chaque tissu possède l'équipement enzymatique permettant la synthèse spécifique de l'une ou l'autre molécule). Ces molécules oxygénées régulent des fonctions aussi diverses que la reproduction, la physiologie cardiaque, la coagulation sanguine, l'hémostase, l'inflammation,

le fonctionnement des glandes endocrines et exocrines... Parmi ces molécules, citons le thromboxane A2 (TXA2), issu de la conversion de l'AA au niveau des plaquettes sanguines, qui est un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire.

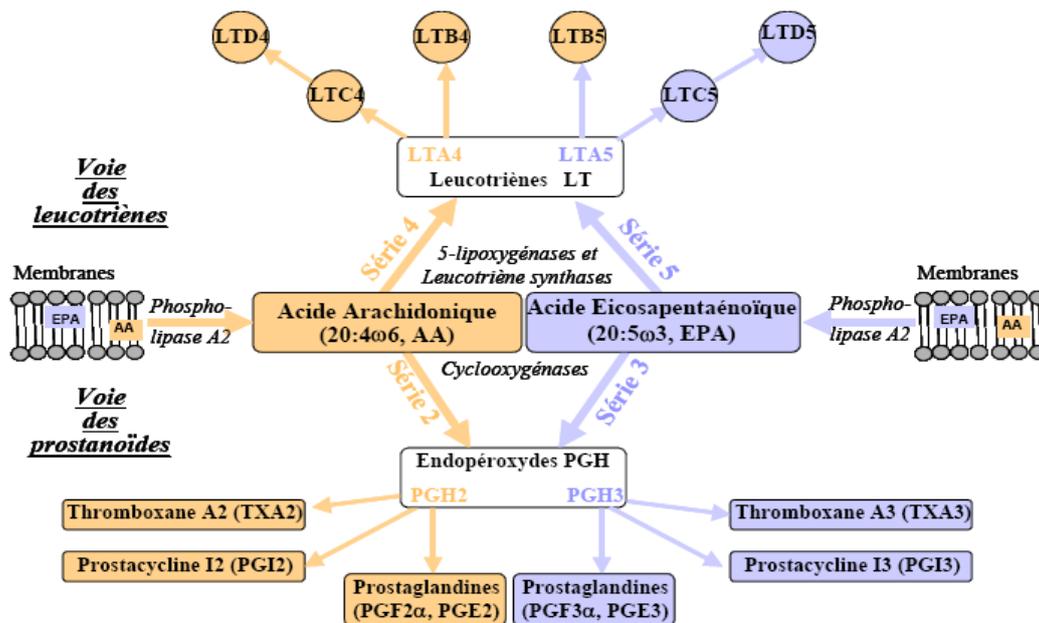


Figure. 93 Métabolisation des AGPI par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes). Chaque famille de molécules comporte 3 séries selon la nature de l'AGPI précurseur. Ces molécules régulent des fonctions diverses : reproduction, coagulation sanguine, hémostase, inflammation...

Chapitre IV

Activité des extraits lipidiques de la nacre et de la chair sur la différenciation des ATDC5



A. Introduction

Devant l'ensemble des données dans la revue bibliographique et les chapitres précédents, il nous est apparu intéressant d'étudier l'effet des molécules extraites de la nacre afin d'évaluer leur capacité à être vecteur d'ostéogénie dans le but d'obtenir un matériau bioactif.

Dans le but d'acquérir nos premières informations quant à une éventuelle toxicité des extraits lipidiques de la nacre et de la chair de *Pinctada radiata* et de déterminer une concentration efficace de ce dernier, une étude préliminaire de mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire a été réalisée sur des cultures de cellules en lignée. Cette étude a permis de restreindre la plage de concentrations testées dans notre étude.

Nous avons utilisé un modèle *in vitro* afin de tester les potentialités d'ostéogénèse de 4 extraits lipidiques : l'extrait lipidique de la nacre de *Pinctada radiata*; l'extrait lipidique de la chair de *Pinctada radiata*, l'ESM (Ethanol soluble Matrix) de la nacre de *Pinctada radiata* et l'ESM de la nacre de *Pinctada margaritifera*.

Nous avons profité en même temps de comparer le pouvoir ostéogénique des extraits ESM des deux espèces *P. radiata* et *P. margaritifera*.

Dans le cadre de cette étude ont été réalisés des colorations rouge alizarine, rouge Sirius et bleu Alcian pour les cellules ATDC5 et rouge alizarine pour les cellules MC3T3.

Dans un deuxième temps, les nouvelles technologies de biologie moléculaire (qPCR) nous ont permis de mener une étude large de l'expression génique des cellules et nous ont permis de réaliser une caractérisation de notre modèle de culture. Ces résultats nous ont ensuite permis de mieux appréhender les éventuelles différences d'expression que l'extrait de la nacre et de la chair de *Pinctada radiata* pouvaient induire.

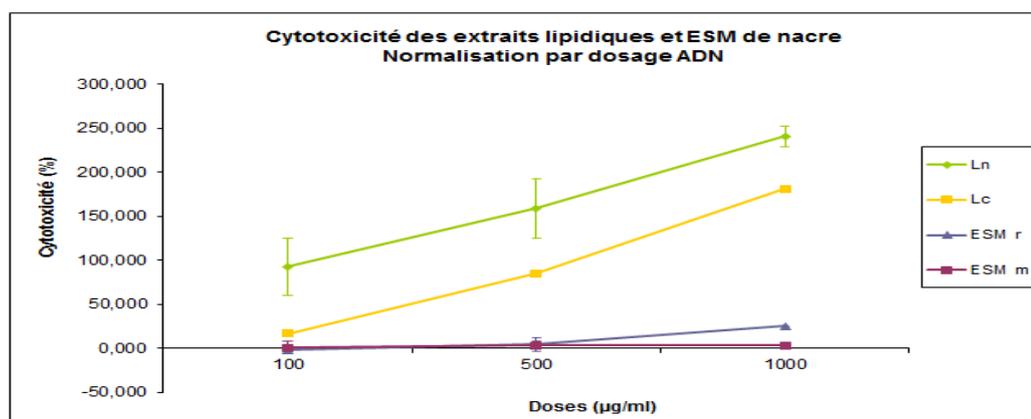
Deux groupes de gènes ont ainsi été étudiés : une première étude a permis d'étudier les gènes impliqués dans l'ossification enchondrale Col1A2, col2A1, Agrécane et colX A1 pour les cellules ATDC5 et une seconde a visé les gènes impliqués dans la physiologie osseuse ostéopontine, ostéocalcine, col1 et RunX2 pour les cellules MC3T3.

L'extrait lipidique de la nacre et de la chair a été fait selon la méthode de Folch (Chapitre matériels et méthode). L'extrait à l'éthanol (ESM) permet d'obtenir l'extrait de nacre qui concentre essentiellement les lipides mais aussi des petites protéines.

B. Etude de cytotoxicité et viabilité

Test de cytotoxicité

LDH



Test de Viabilité

MTT

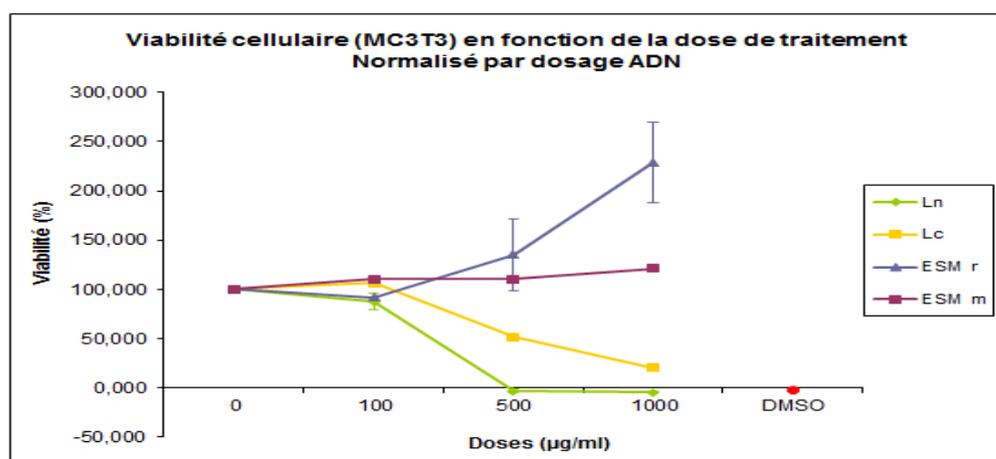


Figure 94 : Effet cytotoxique des lipides de la nacre (Ln) et de la chair (Lc) de l'ESMr et de l'ESMm sur les cellules MC3T3. Test de cytotoxicité, LDH (1) et test de viabilité cellulaire, MTT (2).

Le test LDH permet de mettre en évidence une augmentation croissante de la toxicité en réponse à l'augmentation de la dose de lipides utilisée, avec une cytotoxicité plus importante des lipides de la nacre (Ln) par rapport aux lipides de la chair (Lc) (Fig.94). Ainsi nous n'avons pas enregistré une cytotoxicité des molécules extraits de nacre ESMm et ESMr. Ces résultats sont corrélés à ceux du test MTT démontrant une diminution de la viabilité des cellules suite au traitement par les lipides la cytotoxicité des MC3T3 de souris en culture décroît significativement selon la concentration d'Ln, de 100% à 200µg/ml ($p < 0,01$) et 150% à 500µg/ml ($p < 0,001$) jusque 250% à 1000 µg/ml ($p < 0,001$), mais aussi moins avec les Lc. Il est à noter que dans des conditions similaires, on observe un effet dose et une toxicité plus marquée de Ln. Toutefois, pour la dose utilisée (100µg/ml), la toxicité est faible voire nulle.

ESMr et ESMm n'affectent pas la viabilité des MC3T3, même aux concentrations les plus élevées moins la Lc. Les résultats obtenus montrent donc clairement un effet apoptogène spécifique de Ln mais avec une concentration au-delà de 500 µg/ml. Un tel effet pourrait en partie être dû à la conversion des acides gras de la série n-3 ou n-6 comme par exemple la conversion de l'acide arachidonique en eicosanoïdes par les enzymes COX(Cycloxygénase) et LOX (Lipoxygénase) dont l'activité catalytique génère la production d'anions superoxydes et de radicaux libres contribuant à l'apparition d'un stress oxydant (Samuelsson, B., 1987). Les eicosanoïdes eux-mêmes pourraient être impliqués dans l'effet apoptogène observé et tout ceci est dû soit à l'extraction du Ln ou à sa stérilisation. De plus, ces acides gras (notamment les w3 et w6 EPA et GLA) possèdent une activité cytotoxique voire antitumorale sur les cellules de carcinome (Wigmore *et al.*, 1996, Kuratko and Becker, 1998). En effet, les phospholipides jouent des rôles divers dans le métabolisme cellulaire, notamment du fait de leur participation dans la composition de la membrane cellulaire. Le récepteur de la phosphatidylcholine, par exemple, est un signal de reconnaissance de l'apoptose. L'apoptose donne lieu à une redistribution des lipides membranaires (Arnoult *et al.*, 2001).

C. Activité des extraits lipidiques sur les Pré-chondrocytes murins ATDC5

C.I. Histologie

L'étude des différents extraits, l'extrait lipidique de la nacre (Ln), l'extrait lipidique de la chair (Lc) et l'extrait ESM de la nacre (Br), de *Pinctada radiata* consiste à mettre en évidence la capacité des extraits de la nacre et de la chair à stimuler la différenciation au cours de l'ossification endochondrale jusqu'au stade de minéralisation. Pour cela, nous avons utilisé des cellules pré-chondrogénique dérivant de tératocarcinome AT805 de souris ATDC5. Les ATDC5 seront cultivées en micromasse afin de faire un essai *in vitro* (où les cellules seront dans des conditions qui se rapprochent de celles *in vivo*).

Cette étude histologique a été menée par une coloration Rouge Alizarine afin de visualiser la présence de dépôts calciques par les cellules et une coloration Bleu Alcian afin de mettre en évidence les GAGs (les glycosaminoglycanes) par liaison saline. Ils sont principalement situés à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire. Le Rouge Sirius est utilisé afin de visualiser le collagène.

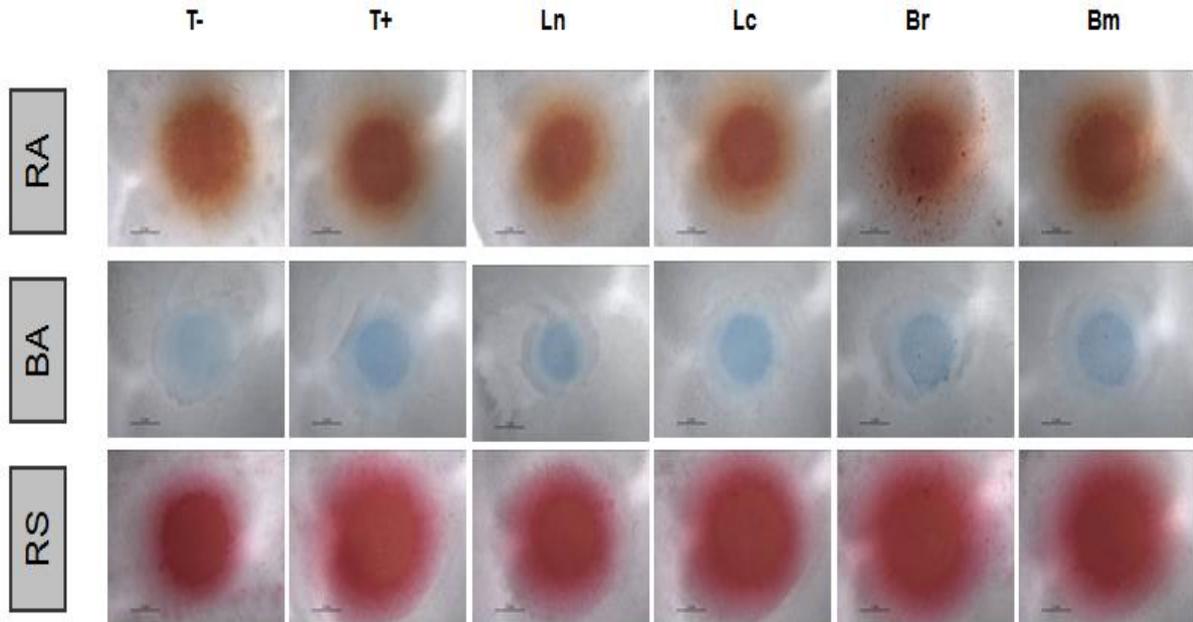
La présence d'inducteurs de minéralisation étant nécessaire pour observer les dépôts *in vitro*, nous avons analysé les effets des extraits en présence d'inducteurs (l'insuline 10 µg.ml⁻¹, acide ascorbique 50µg.ml⁻¹ et β-glycérophosphate 10nM). L'AA et le β-GP sont des inducteurs de minéralisation ostéoblastique qui vont permettre la minéralisation de la matrice extracellulaire au cours du temps. Le premier objectif était d'étudier la minéralisation des cellules ATDC5 cultivées en 3D sur 14 jours dans le milieu DMEM-F12.

Ainsi **T⁻** ou **TS** contenant le milieu de culture des ATDC5 DMEM-F12 est considéré comme un témoin négatif dans cette étude, **T⁺** ou **ITS** contenant du milieu TS +10ug/ml d'insuline est considéré comme témoin positif (Tableau. I), ensuite les différents extraits **Ln** (lipides Nacre *P.radiata*) contenant le milieu ITS + AA (acide ascorbique 50ug/ml) +GP (10mM de β-glycérophosphate) + extrait lipidique de nacre (100µg/ml), **Lc** (lipides Chair *P.radiata*): milieu ITS+ AA + GP + extrait lipidique de chair (100µg/ml), **Br** (ESM *P.radiata*):milieu de

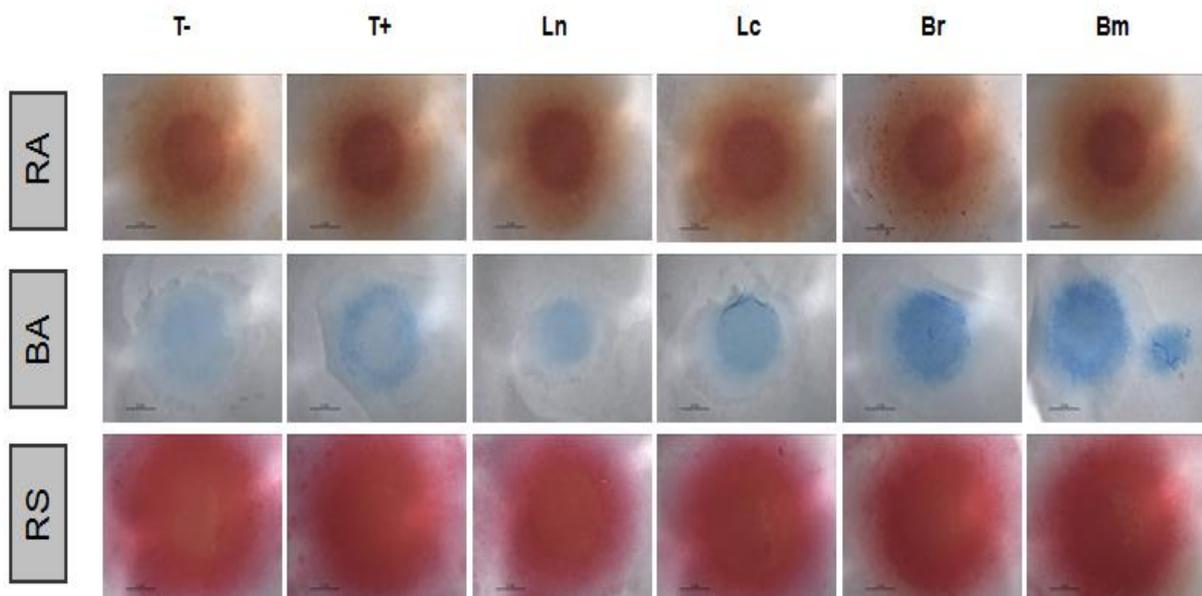
Résultats et discussions

culture ITS + AA + GP + ESM de *P.radiata* (100µg/ml) et **Bm** (ESM *P.margaritifera*):milieu de culture ITS + AA + GP +:ESM de *P.margaritifera* (100µg/ml),ce dernier est considéré comme un témoin positif (Nacre de *Pinctada Margaritifera*) en se basant sur ce témoin positif tout comme l'équipe du Pr Lopez l'a démontré. Notre objectif est de montrer la stimulation des phénomènes d'ostéoinduction et d'ostéogénèse par cet extrait **Br**.

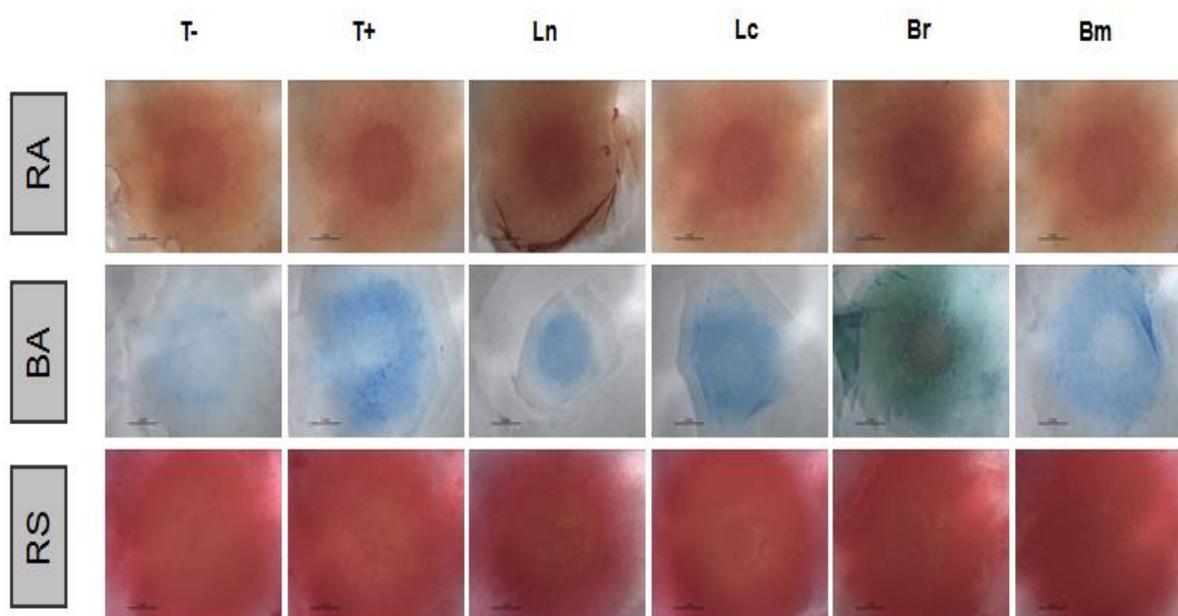
Notre manipulation a été effectuée avec n=3 se présentant dans les figures qui suivent.



J7



J10



J14

Figure. 95 Résultats des colorations (RA, BA et RS) menées sur les pré-chondrocytes murins ATDC5 cultivés en micromasse avec les différents extraits Ln, Lc, Br et Bm à une concentration de 100 μ g/ml à J7, J10 et J14. La position des différents extraits est indiquée. (par colonne) (n=1). (manip1).

La figure.95 représente la position des différents extraits ajoutés au sein de la plaque de 18 puits à une cinétique de 14 jours.

La coloration rouge Alizarine permet de déterminer la capacité de ces cellules à minéraliser. La minéralisation est proportionnelle à la coloration rouge.

A partir de 7 jours de culture, l'intensité de la coloration semble similaire pour tous les extraits à l'exception du Br qui présente visiblement un point calcique dans ces conditions de culture ainsi qu'au 10^{ème} jour de culture.

Par contre, au 14^{ème} jour, une coloration nettement plus intense en présence de Br intense en Ln et moins en LC et Bm.

Les résultats obtenus montrent la capacité des cellules ATDC5 à induire la minéralisation en présence d'AA et de β -GP, et la capacité de ces extraits pour stimuler cette minéralisation.

La coloration au Bleu Alcian n'a donné aucun résultat au niveau macroscopique à partir du 7^{ème} jour de culture puisque nous n'enregistrons pas de différence notable par rapport au témoin positif T+. Par contre nous enregistrons plus d'intensité de coloration des différents extraits par rapport à ce témoin à partir de J10 et enfin une intensité de Br et de Bm au 14^{ème} jours de culture.

Nous avons constaté une coloration bleue dont l'intensité augmente avec le temps de culture de J7 à J14. Donc la quantité de GAGs augmente. Nous pouvons en conclure qu'il y a formation de matrice du cartilage dans le modèle de culture en 3D avec la lignée ATDC5.

Il se peut que la quantité de GAGs augmente avec le temps.

Les colorations au rouge Sirius n'ont donné aucun résultat au niveau macroscopique au 7^{ème} et dixième jour de culture puisqu'on n'enregistre pas de différence notable par rapport au témoin positif T+. Par contre nous avons enregistré une coloration légèrement plus intense au niveau des différents extraits par rapport à ce témoin.

La réaction entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène pourrait se produire avec une cinétique de plus de 14 jours.

Les résultats des tests de minéralisation menés sur les ATDC5 représentés par la figure (95) (annexe.) représente la position des différents extraits ajoutés au sein de la plaque de 24 puits colorations à une cinétique de 14 jours (n=3).

Le contrôle négatif ne montre aucune activité. Par contre, à la concentration de 100 µg/ml de Ln, les pré-chondrocytes ATDC5 minéralisent sous l'effet de l'extrait de Ln ainsi que de Lc dès 7 jours (Fig. 95). Au cours du temps, on constate des dépôts beaucoup plus importants avec des points calciques jusqu'au quatorzième jour de culture avec la coloration rouge Alizarine et nous constatons que l'intensité de minéralisation de Ln est intense mais qui n'est pas présente sur toute la surface du puits contrairement à Lc.

Nous supposons que cet extrait présenterait une minéralisation avec des points calciques plus intenses si nous procéderons à l'ensemencement en micromasse soit 30 µL d'une suspension de cellules ATDC5 c'est-à-dire 600 000 cell/micromasse/puits au lieu de 200000 cellules

pour mieux visualiser les résultats puisque l'extrait lipidique de la chair est plus riche que celui de la nacre et pour également se rapprocher plus de l'environnement 3D *in vivo* et pour éviter la sensibilité des cellules à l'hypoxie.

Nous constatons également que l'intensité des points calciques des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm augmente au cours de cette cinétique. Les cellules ATDC5 montrent une capacité à induire une minéralisation en présence de ces extraits. Egalement la présence d'AA et de β -GP favoriserait une apparition plus rapide de la minéralisation. Ainsi nous avons constaté une coloration dont l'intensité de coloration augmente avec le temps de contact.

Nous pouvons en conclure que la lignée ATDC5 utilisée est bien capable de minéraliser et que la culture en 3D favorise la minéralisation.

En comparant l'apparition des points calciques du Br par rapport au témoin positif Bm, cette dernière montre plus de point calciques surtout à J7. On peut en conclure qu'il faut augmenter la concentration de Br puisqu'il s'agit de deux espèces de pintadines différentes. L'extraction de Bm a été faite initialement avec une quantité de 500mg. Si nous procédons de la même façon pour Br.

Nous n'enregistrons pas de différence notable par rapport au témoin positif T+ de la coloration au Bleu Alcian à partir du 7^{ème} jour de culture. Par contre nous observons plus d'intensité de coloration des différents extraits par rapport à ce témoin à partir de J10 jusqu'au J14 avec une intensité plus visible avec les Lc. Nous pouvons déduire de ces résultats que Lc augmente la quantité de GAGs et la formation de matrice du cartilage dans le modèle de culture en 3D avec la lignée ATDC5.

Les colorations au rouge Sirius montrent qu'il n'y a pas de différence entre les différents extraits et le témoin positif au niveau du septième jour de culture. Par contre l'intensité de ce colorant est observée nettement à partir du 10^{ème} jour de culture jusqu'au 14^{ème} jour pour tous les extraits mais plus accentué au niveau du Br en le comparant avec son témoin positif Bm.

Nous pouvons conclure que Br semble avoir une activité sur les collagènes puisqu'il favorise la production de la réaction entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène.

C.II. Expression des gènes (q PCR)

L'étude par qPCR de l'effet des différents extraits a été menée afin de déterminer l'influence des différents extraits sur la variation de l'expression de gènes impliqués au cours du processus d'ossification endochondrale. Les ARNs sont extraits à différents temps de culture puis transformés en ADNc par RT pour être utilisés en PCR quantitative. L'expression des gènes *Col I*, *Col II*, *Col X* et *Agc* est étudiée.

L'analyse de l'expression génique a été réalisée à partir des cellules ATDC5 cultivées en 3D en présence des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm avec du AA et du β -GP de J1, J7, J10 et J14 (Figure 96).

Ainsi T⁻ ou TS contenant le milieu de culture des ATDC5 DMEM-F12 est considéré comme un témoin négatif dans cette étude, T⁺ ou ITS contenant du milieu TS +10 ug/ml d'insuline est considéré comme témoin positif (Tab. I), ensuite les différents extraits Ln (lipides Nacre *P.radiata*) contenant le milieu ITS + AA (acide ascorbique 50ug/ml) +GP (10mM de β -glycérophosphate) + extrait lipidique de nacre (100 μ g/ml), Lc (lipides Chair *P.radiata*): milieu ITS+ AA + GP + extrait lipidique de chair (100 μ g/ml), Br (ESM *P.radiata*):milieu de culture ITS + AA + GP + ESM de *P.radiata* (100 μ g/ml) et Bm (ESM *P.margaritifera*):milieu de culture ITS + AA + GP +:ESM de *P.margaritifera* (100 μ g/ml), ce dernier est considéré comme un témoin positif (Nacre de *Pinctada margaritifera*) .

La Figure (96) présente l'évolution au cours du temps de l'activité des différents gènes impliqués dans la chondrogénèse (col I, col II, Agrécane et col X) sur les cellules de la lignée ATDC5 cultivée en micromasse sur une cinétique de 14 jours avec des temps d'arrêt à J1, J7, J10 et J14 ainsi que le rôle joué des différents extraits sur l'expression de ces gènes.

Tous les points sont comparables les uns par rapport aux autres, car ils ont tous été normalisés par rapport au point J7 du contrôle négatif, afin d'observer l'évolution au cours du temps du phénotype chondrocytaire.

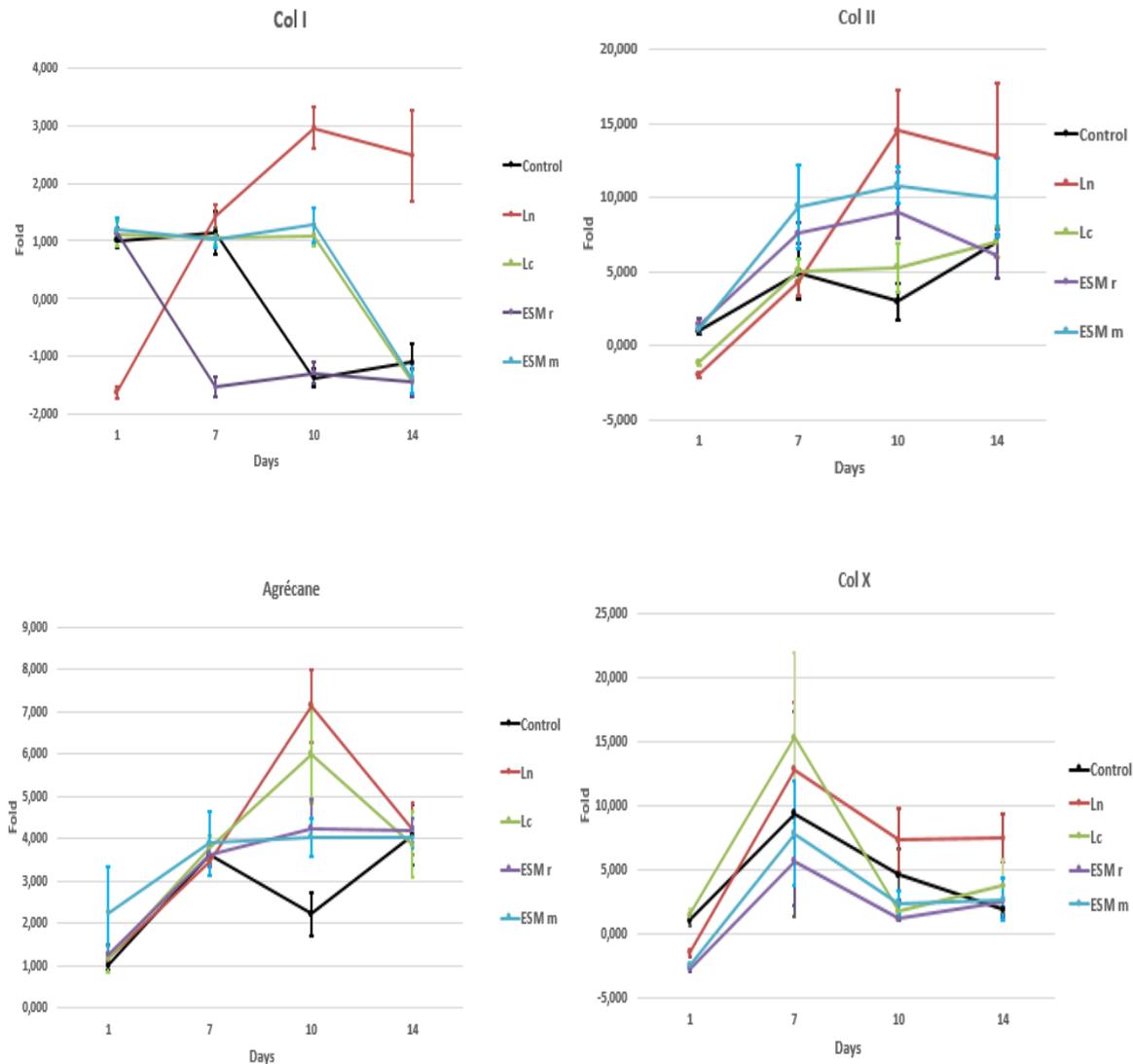


Figure 96. Effets des lipides Ln et Lc et ESMr et ESMm sur l'expression des différents gènes impliqués dans la chondrogénèse (col I, col II, Agrécane et col X) sur les cellules de la lignée ATDC5 cultivée en micromasse sur une cinétique de 14 jours avec des temps d'arrêt à J1, J7, J10 et J14. NADPH a été utilisé comme gène de ménage. Les calculs de « fold » sont réalisés avec les valeurs du contrôle à J1.

Le collagène de type I est un composant majeur des cellules mésenchymateuses indifférenciées, son expression est importante tout au long de la cinétique sous l'effet de Ln qui augmente de J1, présente un pic au 10^{ème} jour de culture puis diminue légèrement à J14, sous l'effet de Lc. L'expression du colII est stable jusqu'au dixième jour de culture puis diminue progressivement jusqu'à J14. L'expression de col I sous l'effet de ESMr est stable de J1 à J7 puis diminue à J10 et augmente jusqu'à J14. Par contre ESMm diminue de J1 à J7 augmente jusqu'à J10 et diminue jusqu'à J14. ESMm et Lc semble avoir le même effet sur ce gène

Col II se trouve dans le cartilage hyalin, c'est-à-dire au niveau des articulations. Les résultats montrent une nette augmentation de l'activité de col II en présence de Ln supérieur à celle du contrôle. L'extrait montre une augmentation visible dès le premier jour tandis que cette augmentation est observable dès J7 avec ESMm et ESMr qui suivent la même évolution et puis diminuent légèrement jusqu'au J14. L'expression du colIII sous l'effet de Lc montre un pic à partir de J7 puis un deuxième à J14 mais cette expression n'est pas assez forte en comparant avec Ln. Ainsi l'expression de ce gène sous l'effet des différents extraits est assez importante et dépasse les 10 fold en comparant avec celle du contrôle.

L'agrécanne est un composant majeur du cartilage, une augmentation de son expression au cours de la cinétique est observée, confirmant une différenciation chondrogénique. De plus, l'expression est plus importante lorsque les cellules sont en présence de molécules de nacre Ln un peu moins Lc. L'effet de ces deux extraits sur ce gène suivent la même évolution et expression de gène augmente jusqu'au J10 puis diminue légèrement. Par contre son expression sous l'effet de ESMm et ESMr augmente jusqu'au J7 puis se stabilisent jusqu'au J14. Ainsi ces derniers suivent la même évolution au cours de cette cinétique.

Rappelons que les cellules ATDC5 sont des précurseurs de chondrocytes et de chondrocytes hypertrophiques.

Col X est caractéristique du cartilage hypertrophique et minéralisé, son expression augmente au fur et à mesure de la cinétique. Nous avons enregistré un pic à J7 puis une légère diminution et un autre pic à J10. Son expression est importante si nous le comparons par rapport au contrôle et dont l'expression atteint 15 fold. L'expression est plus forte et plus

rapide pour les cellules traitées avec Lc. Le pic d'expression pour Lc s'effectue plus tôt qu'avec Ln, même si celui-ci présente une expression plus élevée.

De plus, l'expression est moins importante par rapport à la présence de Lc et Ln lorsque les cellules sont en présence de molécules de nacre ESMm et ESMr ; l'expression de ce gène suit la même évolution en présence de ces différentes molécules de nacre. Ces résultats vont dans le sens d'une induction plus rapide et plus forte de la chondrogenèse par les molécules de la nacre en augmentant l'expression d'un gène clé de l'hypertrophie et de la minéralisation.

Si nous comparons l'activité de ces différents gènes (coll, ColIII, agrécane et ColX) des 4 extraits testés (Fig. 96) par rapport aux figures (le reste des moyenne n=3 voir annexe (12)) nous trouverons les mêmes résultats. Le gène coll est sous exprimé proportionnellement au temps de culture, sauf en présence de Ln et ceci est visible à J10 et J14.

Les résultats montrent un pic d'expression pour le contrôle positif T+ (ITS+AA+GP) à J7, alors que ce pic est retardé et diminue lorsque les cellules sont traitées avec du Ln et un peu moins Lc. Cependant, les pics d'expression sont plus faibles en présence d'ESMm et ESMr.

L'aggrécane est un composant majeur du cartilage, on observe une augmentation de son expression au cours de la cinétique, confirmant une différenciation chondrogénique. De plus, l'expression est plus importante lorsque les cellules sont en présence de molécules de nacre. Contrairement aux autres gènes, ainsi nous enregistrons son expression inhibée en présence de tous les extraits sauf le contrôle positif en présence d'inducteurs AA et GP mais une augmentation se traduit par les pics d'expression de tous les extraits à partir de J10 et se stabilise jusqu'à J14. Par contre à n=1 l'action de l'aggrécane est inhibée donc il faudrait augmenter la durée de la cinétique pour voir si l'expression aura lieu plus tard.

L'analyse de l'expression de gènes clés impliqués dans le processus d'ossification endochondrale montre une action non négligeable du traitement des cellules ATDC5 par extraits lipidiques de la nacre et de la chair ainsi par les molécules extraites de la poudre de nacre ESMr et ESMm.

On observe pour l'extrait Ln une nette augmentation de l'activité Col I, supérieure à celle du contrôle positif T+. L'extrait montre une augmentation visible dès 10 jours à la concentration de 100µg de Ln/ ml tandis que cette augmentation n'est pas observable pour le reste des extraits qui suivent la même évolution au cours de cette cinétique de 14 jours.

D. Discussion et conclusion

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité des différents extraits, l'extrait lipidique de la nacre (Ln), l'extrait lipidique de la chair (Lc) et l'extrait ESM de la nacre (Br), de *Pinctada radiata* sur l'ossification enchondrale en vue de leur utilisation pour des applications pharmaceutiques ou médicinales dans le futur. A notre connaissance l'étude sur les Lc, Ln et Br de l'huître perlière *Pinctada radiata* est une première à l'échelle nationale et internationale. Cette étude consiste à mettre en évidence la capacité des extraits de la nacre et de la chair à stimuler la différenciation jusqu'au stade de minéralisation. Des études ont mis en évidence la capacité des cellules ATDC5 à minéraliser naturellement dans des conditions de culture appropriées (Atsumi *et al.*, 1990).

Les cellules ATDC5 s'avèrent un bon modèle pour la culture en 3 D proche des chondrocytes humains (Tare *et al.*, 2005).

Nous avons fait l'étude ont été réalisées sur les Bm afin de comparer avec nos extraits puisque déjà des études menées sur ces extraits dans le laboratoire et à différentes concentrations. Pour cela, nous avons utilisés des cellules pré-chondrogéniques dérivant de tératocarcinome AT805 de souris ATDC5. Ces derniers seront aussi cultivés en micromasse *in vitro* (où les cellules seront dans des conditions qui se rapprochent de celles *in vivo*). Les résultats obtenus montrent que les cellules ATDC5 ont bien la capacité de minéralisation en présence d'inducteurs d'insuline, d'AA et de β -GP et celle-ci est plus intense lorsque les cellules sont traitées avec ces différents extraits.

De nombreuses études ont démontré que la nacre possédait des propriétés ostéogéniques (Lopez *et al.*, 1992, 1994, 1995, 2008, Yutian *et al.*, 2006). L'objectif de cette étude consiste à étudier le rôle des molécules de la nacre sur la régulation de l'ossification endochondrale en utilisant une lignée cellulaire préchondrogénique.

Le premier objectif était d'étudier la minéralisation des cellules ATDC5 cultivées en 3D durant 14 jours dans le milieu DMEM-F12 ITS par une étude histologique.

Cette étude a été menée par une coloration Rouge Alizarine afin de visualiser la présence de dépôts calciques par les cellules de la lignée osseuse colorés avec le Bleu Alcian afin de mettre en évidence les GAGs (les glycosaminoglycanes) par liaison saline. Ils sont

principalement situés à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire et le Rouge Sirius afin de visualiser du collagène.

La présence d'inducteurs de minéralisation étant nécessaire pour observer les dépôts *in vitro*. Nous avons analysé les effets des extraits en présence d'inducteurs (l'insuline 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, acide ascorbique 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et β -glycérophosphate 10nM). L'AA et le β -GP sont des inducteurs de minéralisation ostéoblastique qui vont permettre la minéralisation de la matrice extracellulaire au cours du temps. Cependant, la présence des deux inducteurs AA et GP, favorise la minéralisation puisque l'on observe une coloration rouge plus rapidement.

La lignée ATDC5 est un modèle très intéressant et validé pour étudier la différenciation chondrogénique. Dans la littérature cette lignée a été revalidée par réalisation d'une coloration au rouge Alizarine sur une cinétique de 4 à 28 jours (Challa et *coll.*, 2010). Dans l'étude de Challa et ses collègues, la minéralisation se fait au niveau du quatorzième jour. La coloration rouge Alizarine permet de déterminer la capacité de ces cellules à minéraliser. La minéralisation est proportionnelle à la coloration rouge. L'augmentation de l'intensité de coloration est aussi proportionnelle au temps.

Ainsi à partir de 7 jours de culture, l'intensité de la coloration semble similaire pour tous les extraits à l'exception du Br qui présente visiblement un point calcique dans ces conditions de culture ainsi qu'au 10^{ème} jour de culture. Par rapport à l'étude de Challa et son équipe, la coloration rouge apparaît plus tôt et est plus intense avec AA et β -GP, ce qui prouve le rôle de ces inducteurs. Les extraits de nacre semblent avoir un effet positif sur la minéralisation des cellules ATDC5. Nous pouvons en conclure que la lignée ATDC5 utilisée est bien capable de minéraliser et que la culture en 3D favorise la minéralisation.

Les extraits de nacre ont bien une influence positive sur la minéralisation des cellules ATDC5. Par contre, au 14^{ème} jour, une coloration nettement plus intense en présence de Br intense en Ln et moins en LC et Bm. D'après ces résultats nous pouvons conclure que plus le temps de contact entre les extraits et les ATDC5 est long plus la minéralisation est importante. Donc les effets de l'ESM sur les cellules ATDC5 augmentent en fonction du temps de contact. Ces molécules organiques Br ont ainsi été extraites et ont démontré une stimulation des marqueurs de la différenciation des ostéoblastes.

Le contrôle négatif ne montre aucune activité. Par contre, à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ln, les pré-chondrocytes ATDC5 minéralisent sous l'effet de l'extrait de Ln ainsi que de Lc

dès 7 jours. Au cours du temps, on constate des dépôts beaucoup plus importants avec des points calciques jusqu'au quatorzième jour de culture avec la coloration rouge Alizarine et nous constatons que l'intensité de minéralisation de Ln est intense mais qui n'est pas présente sur toute la surface du puits contrairement à Lc.

Nous supposons que cet extrait présente une minéralisation avec des points calciques plus intenses si nous procédons à l'ensemencement en micromasse soit 30 μ L d'une suspension de cellules ATDC5 c'est-à-dire 600 000 cell/micromasse/puits au lieu de 200 000 cellules pour se rapprocher de l'environnement *in vivo*, l'hypothèse devient la suivante ; plus la concentration en cellules est élevée, moins l'ensemble de ces cellules est en contact avec l'oxygène. Les cellules situées au centre de la micromasse sont certainement en hypoxie or dans le corps humain le cartilage est en condition hypoxique. Pour mieux visualiser les résultats entre Lc et Ln puisque l'extrait lipidique de la chair est plus riche que celui de la nacre. Nous constatons également que l'intensité des points calciques des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm augmente au cours de cette cinétique. Les cellules ATDC5 montrent une capacité à induire une minéralisation en présence de ces extraits.

Nous avons également constaté une coloration bleue dont l'intensité augmente avec le temps de culture de J7 à J14. Donc la quantité de GAGs augmente, nous pouvons en conclure qu'il y a formation de matrice du cartilage dans le modèle de culture en 3D avec la lignée ATDC5.

Ces résultats concordent avec ceux trouvés par (Mackie *et al.*, 2008). Ces cellules vont proliférer et synthétiser une matrice de collagène de type I, III et de fibronectine. Elles vont se différencier en chondrocytes entre le 7ème et le 21ème jour et vont synthétiser une matrice cartilagineuse avasculaire constituée de collagène de type II, IX et XI, d'agréganes (Mackie *et al.*, 2008) et de protéoglycanes. Cette matrice va constituer un cal mou qui va dans un premier temps stabiliser la fracture. Puis, la maquette cartilagineuse s'amplifie, conduisant à l'hypertrophie des chondrocytes La matrice osseuse, elle-même, de par sa composition protéique notamment, participe à la régulation des processus cellulaires et moléculaires de la réparation osseuse. Les protéines collagéniques jouent un rôle structural et les protéines non collagéniques vont jouer le rôle de modulateurs biologiques (Bornstein et Sage, 2002).

Les colorations au rouge Sirius montrent qu'il n'y a pas de différence entre les différents extraits et le témoin positif au niveau du septième jour de culture. Par contre l'intensité de ce colorant est observée nettement à partir du 10^{ème} jour de culture jusqu'au 14^{ème} jour pour tous les extraits mais plus accentuée au niveau du Br en le comparant avec son témoin positif Bm.

Nous pouvons conclure que Br semble avoir une activité sur les collagènes puisqu'elle favorise la production de la réaction entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène.

Le deuxième objectif était de déterminer l'influence des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm sur la variation de l'expression des gènes connus pour être impliqués dans le processus d'ossification endochondrale.

Les résultats obtenus montrent une action des molécules extraites de la nacre sur les cellules ATDC5. Ainsi, l'ajout des différents extraits aurait une influence sur des gènes clés du processus d'ossification endochondrale. En effet, l'analyse des résultats obtenus par qPCR montre que les extraits agissent sur l'expression des gènes *Col I*, *Col II*, *Col X*, et *Agc* dans le sens d'une différenciation hypertrophique.

En milieu de contrôle, le profil général d'expression génique n'est pas similaire pour les 4 gènes, ils sont exprimés au cours du temps, les ESM Br et Bm suivent la même évolution sur les différents gènes à l'exception du Col I. En présence d'insuline, AA, GP, le gène, *col II* est toujours sous-exprimé proportionnellement au temps à l'exception de la présence de Ln tandis que l'expression des gènes *col II* et *aggrecan* augmente en présence des différents extraits. Nous pouvons supposer qu'il y a une tentative de récupération du phénotype chondrocytaire ou l'induction de la chondrogenèse par Ln.

En présence des différents extraits, les différents gènes s'expriment à partir du 7^{ème} jour de culture. Ainsi le gène *Col II* s'exprime jusqu'à J14, l'expression du *Coll II* favorise la prolifération et la différenciation des cellules préchondrogénique (Goldring *et al.*, 2006). Donc la suexpression de ce gène en présence de Ln par rapport aux autres extraits montre bien l'importance des lipides totaux de la nacre dans ce processus et nous supposons d'après nos études que la composition en phospholipides particulièrement les glycérophospholipides (PC,

PE, PI et PS) composants principaux des membranes cellulaires jouent un rôle important et directe sur ce processus et spécialement les acides gras de la série n-3 et de la série n-6. Ceci est confirmé par l'effet du Ln sur la sur expression de l'agrécane composant majeur du cartilage et marqueur de la différenciation terminale des chondrocytes (Goldring *et al.*, 2006) avec le col II c'est un marqueur de chondrogénèse.

Le pic d'expression du col X se fait à partir du septième jour de culture et se stabilise jusqu'à J14. C'est un marqueur d'hypertrophie et de minéralisation et calcification de la matrice du cartilage. Son expression est rapide sous l'effet des différents extraits surtout Ln nous pouvons supposer que la richesse de la chair en acides gras polyinsaturés favorise ce processus.

Nous pouvons en conclure que les cellules ATDC5 progressent vers un état hypertrophique plus particulièrement à J7. Le gène colX est dans ce cas le marqueur le plus représentatif de la progression du phénotype hypertrophique. Le gène colX, le marqueur de référence de l'hypertrophie est également encore plus surexprimé en présence surtout de Lc. D'après ces résultats nous pouvons dire que Lc accélère la différenciation hypertrophique. Ainsi après différenciation des cellules en chondrocytes, les cellules cessent de produire du collagène (I, III,V) mais commence à exprimer les composants typiques du cartilage y compris les collagènes II, IX, XI et les agrécanes protéoglycanes (Delise *et al.*, 2000, Dreier ; 2010).

Les protéoglycanes (PG) qui sont des glycoprotéines auxquelles sont attachées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont des polymères d'unités disaccharidiques qui s'associent à une grande variété de protéines, matricielles ou membranaires, dont plusieurs récepteurs de facteurs de croissance et cytokines.

Nous constatons de façon générale que l'étude des gènes après culture en micromasse nous donne des résultats explicites. Le but à long terme est la création d'un biomatériau implantable chez l'homme en utilisant le principe pro-minéralisant pour l'os à base d'AG polyinsaturés. L'utilisation des propriétés des molécules de nacre ESM et des différents extraits peut être envisagée dans les cas de traumatismes osseux ou de pathologies provoquées par une perturbation dans la régulation de la croissance endochondrale de l'os conduisant à des anomalies comme le nanisme, des difformités du squelette ou prédisposant à des maladies comme l'arthrose, arthrite, ostéoporose et particulièrement les pathologies du cartilage.

Chapitre V

Activité des extraits lipidiques de la nacre et de la chair sur la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3



A. Activité des extraits lipidiques sur les pré-ostéoblastes MC3T3

A.I. Histologie

Nous avons vu précédemment que les différents extraits, l'extrait lipidique de la nacre (Ln), l'extrait lipidique de la chair (Lc) et l'extrait ESM de la nacre (Br), induisent la différenciation des Préchondrocytes vers le phénotype chondrocytes hypertrophiés. Les pré-ostéoblastes sont des cellules de la lignée ostéoblastique, prédifférenciées et capables de minéraliser après avoir atteint un stade de maturation.

L'étape suivante consiste donc à mettre en évidence la capacité de ces extraits à stimuler l'ostéogénèse jusqu'au stade de minéralisation. Pour cela, nous avons utilisé des cellules pré-ostéoblastiques de la lignée ostéoblastique murine immortalisée capable de se différencier en ostéoblastes minéralisant. Ce sont des ostéoblastes murins qui possèdent la capacité de se différencier en ostéocytes sous l'effet de l'acide ascorbique et de former alors une matrice minérale en présence de 3 à 4 mM de β -glycérophosphate dans le milieu de culture.

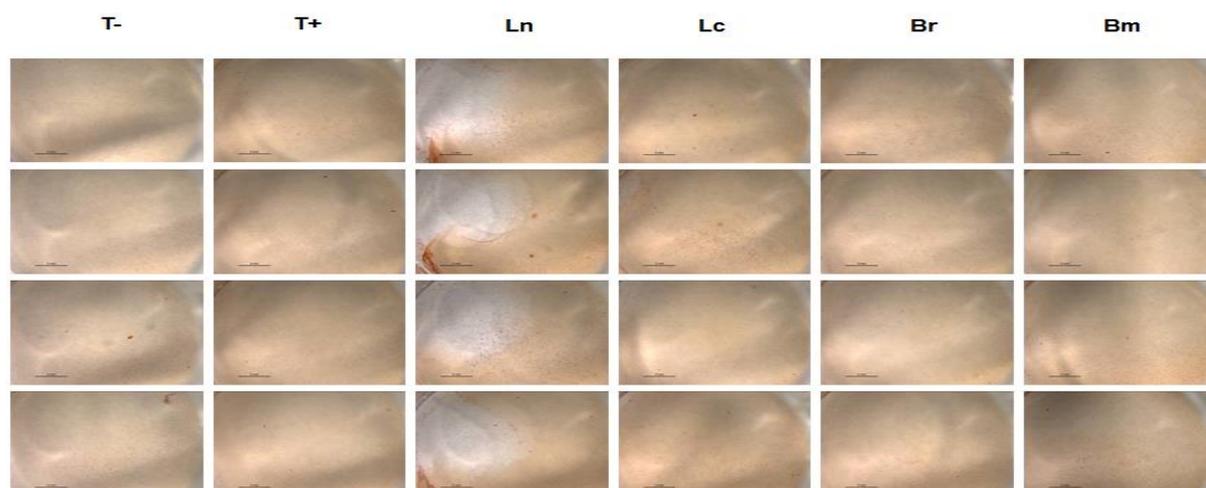
L'étude de l'apparition de dépôts minéralisés a été réalisée par coloration au rouge d'alizarine afin de visualiser les cellules avec leurs dépôts calciques. La présence d'inducteurs de minéralisation étant nécessaire pour observer les dépôts *in vitro*, nous avons analysé les effets des extraits en présence d'inducteurs (acide ascorbique 50 μ g.ml⁻¹ et β -glycérophosphate 10nM).

Le premier objectif était d'étudier la minéralisation des cellules MC3T3 cultivées en monocouche sur 14 jours dans le milieu α MEM sous six conditions.

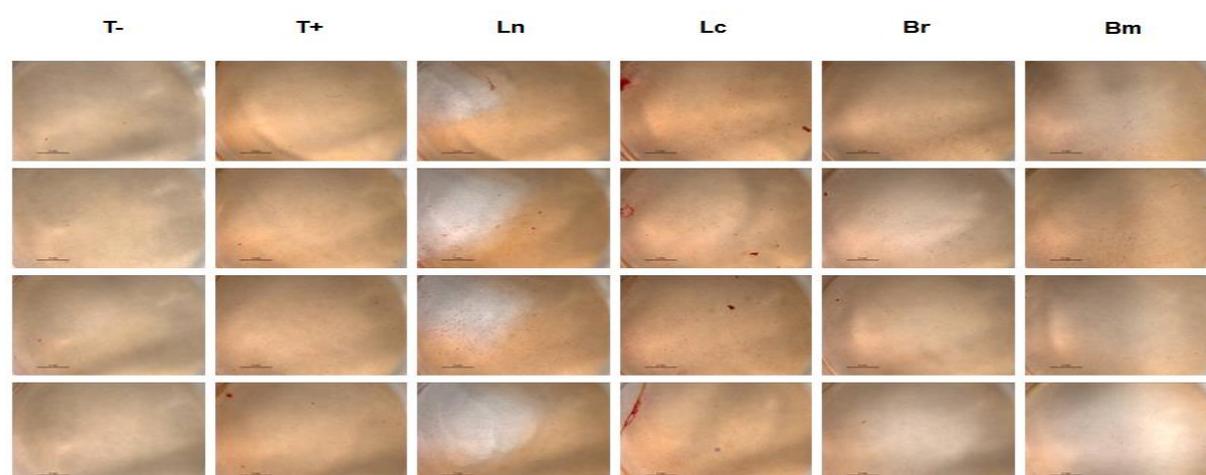
Ainsi T^- : contenant le milieu de culture des MC3T3 α MEM est considéré comme un témoin négatif dans cette étude,

T^+ contenant du milieu de culture α MEM + AA (acide ascorbique 50 μ g/ml) +GP (10mM de β -glycérophosphate) T^+ est considéré comme témoin positif, ensuite les différents extraits

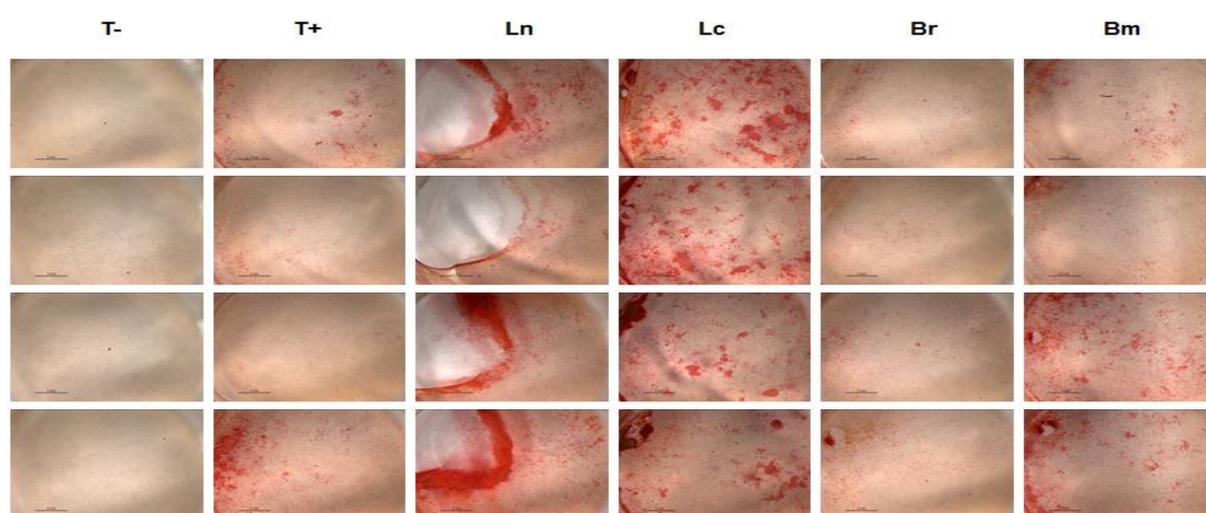
Ln milieu de culture α MEM + AA + GP + extrait lipidique de nacre (100 μ g/ml), **Lc** (lipides Chair *P.radiata*): milieu de culture α MEM + AA + GP + extrait lipidique de chair (100 μ g/ml), **Br** (ESM *P.radiata*): milieu de culture α MEM + AA + GP + ESM de *P.radiata* (100 μ g/ml) et **Bm** (ESM *P.margaritifera*): milieu de culture α MEM + AA + GP + ESM de *P.margaritifera* (100 μ g/ml), ce dernier est considéré comme un témoin positif (Nacre de *Pinctada margaritifera*) en se basant sur ce témoin positif tout comme l'équipe du Pr Lopez a démontré, également, l'activité de Bm sur les ostéoblastes humains (Brion *et al.*, 2012, 2014). Notre objectif est de montrer la stimulation des phénomènes d'ostéoinduction et d'ostéogénèse par cet extrait **Br**. Notre manipulation a été effectuée avec n=3. Elle est représentée dans les figures qui suivent (*Photos Leica M80*).



J7



J10



J14

Figure 97. Effets des différents extraits lipides de la nacre (Ln) et de la chair (Lc), de l'ESMr et de l'ESMm sur la capacité de minéralisation des cellules MC3T3 après 14 jours de traitement. Coloration Rouge Alizarine. La position des différents extraits est indiquée par colonne (n=3).

La figure (97) représente la position des différents extraits ajoutés au sein de la plaque de 24 puits, ainsi que les résultats des différentes colorations à une cinétique de 14 jours (n=2) et le résultat du dosage de la coloration rouge alizarine après décoloration, par spectrophotométrie à 405nm(2).

Les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% et colorées par une solution de Rouge Alizarine 1%. Cette coloration a été réalisée pour visualiser la capacité de minéralisation des cellules et quantifiée(1), après décoloration, par spectrophotométrie à 405nm(2).

Le Rouge Alizarine est un pigment rouge qui permet de déterminer la présence de dépôts calciques par les cellules de la lignée osseuse.

La coloration rouge Alizarine permet de déterminer la capacité de ces cellules à minéraliser. La minéralisation est proportionnelle à la coloration rouge.

Le contrôle négatif ne montre aucune activité. Par contre, la présence des différents traitements au cours de cette cinétique suit la même évolution que le témoin positif.

Un léger dépôt est visible en Lc, à l'extrémité du tapis cellulaire au dixième jour de culture.

Au cours du temps, on constate des dépôts beaucoup plus importants avec des points calciques jusqu'au quatorzième jour de culture avec la coloration rouge Alizarine et nous constatons que l'intensité de minéralisation de Ln et Lc est intense, légère en Bm et moins en Br, la minéralisation de ce dernier est clairement visible est intense par l'annexe (13).

A partir de 7 jours de culture, l'intensité de la coloration rouge alizarine semble similaire pour tous les extraits à l'exception du Ln qui présente un dépôt calcique. Au dixième jour de culture une minéralisation légère des différents extraits est présentée après décoloration et le dosage de la coloration rouge alizarine n'est pas assez visible macroscopiquement, par contre ce dépôt calcique est visible en Bm.

La minéralisation se traduisant par un dépôt calcique devient plus intense à la fin de cette cinétique au J14 par rapport à T+. La minéralisation est proportionnelle à la coloration rouge au cours du temps. Ainsi un dépôt calcique est visible en Lc, Br et plus significatif en Bm, Ln est le moins visible en comparant aux résultats de dosage de la coloration rouge Alizarine.

Nous pouvons conclure qu'il faut peut être doublée la concentration du Ln à 200µg/ml au lieu de 100 µg/ml.

Le dosage de la coloration rouge alizarine après décoloration était nécessaire afin de vérifier les résultats se traduisant par la présence des dépôts calciques à l'échelle macroscopique et les confirmer que la minéralisation a été induite en fonction du temps. La cinétique est plus élevée successivement en Lc, Ln, Bm et Br.

Dosage RA MC3T3 (n=3)

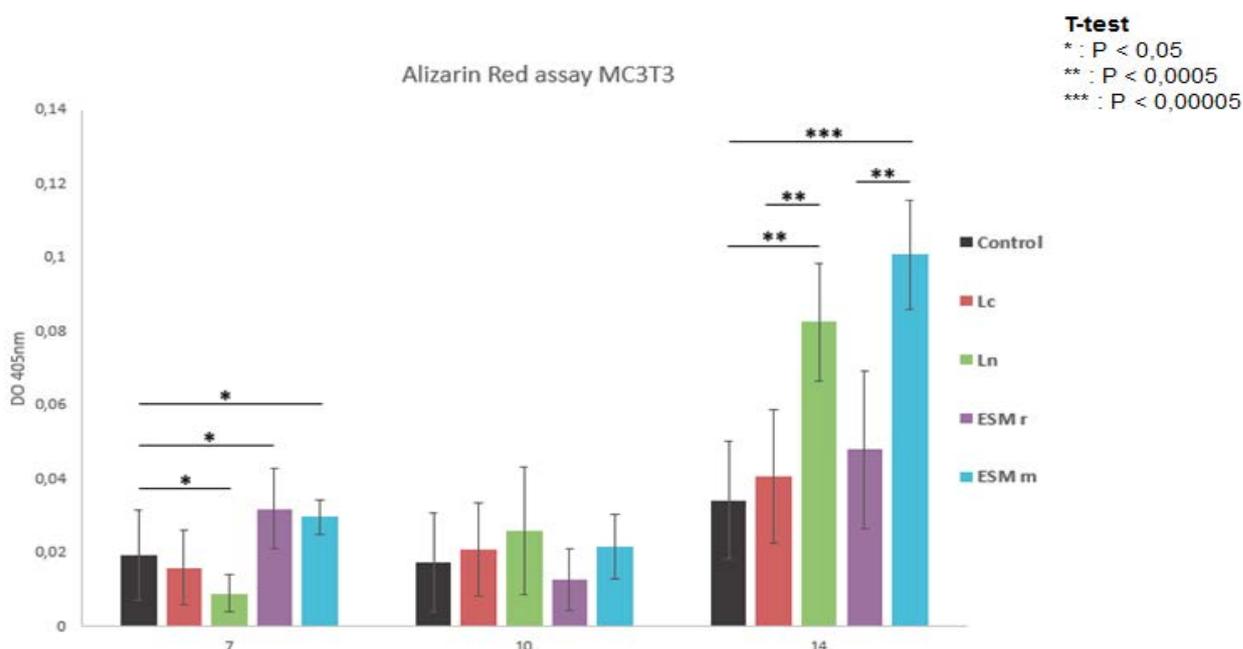


Figure 98. Dosage de la Coloration Rouge Alizarine sur des différents extraits lipidiques de la nacre (Ln) et de la chair (Lc), de l'ESMr et de l'ESMm sur la capacité de minéralisation des cellules MC3T3 après 14 jours de traitement. Analyse statistique : T-test ($P < 0,05^*$; $P < 0,0005^{**}$).

Le dosage de la coloration rouge Alizarine sur les cellules MC3T3 traitées par les lipides de la nacre, de la chair et de l'ESMr de l'huître perlière *Pinctada radiata* et de l'ESMm de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, nous a permis de déduire que les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 minéralisent sous l'effet des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm à partir du 10 jours (Fig. 98). Au cours du temps, nous remarquons des dépôts beaucoup plus importants.

La coloration Rouge Alizarine démontre la présence de calcium précipité pour les cellules contrôle et traitées par les lipides de la chair à partir de 10 jours de traitement. Par contre la minéralisation commence à partir du J7 pour les extraits de nacre ESMr et ESMm elle est significative par rapport aux autres extraits ($p < 0.05$). Les lipides de la nacre induisent la minéralisation des cellules à partir de J14 tout comme ESMm. Nous pouvons conclure que l'effet dose-dépendant est confirmé.

A.II. Expression des gènes (q PCR)

L'étude des différents extraits, l'extrait lipidique de la nacre (Ln), l'extrait lipidique de la chair (Lc) et l'extrait ESM de la nacre (Br), de *Pinctada radiata* consiste à mettre en évidence la capacité des extraits de la nacre et de la chair à stimuler l'ostéogénèse jusqu'au stade de minéralisation, ainsi les préostéoblastes entrent dans le processus d'ossification membranaire. Pour cela, nous avons utilisé des cellules pré-ostéogéniques murins de souris MC3T3. Ces cellules sont cultivées en monocouche.

L'étude par qPCR de l'effet des différents extraits a été menée afin de déterminer l'influence des différents extraits sur la variation de l'expression de gènes impliqués au cours du processus d'ossification membranaire. Nous avons étudié le rôle des lipides de la nacre et de la chair ainsi que les ESMr dans l'induction de facteurs de transcription ostéogénique tels que Ostéopontine, ostéocalcine, ColI et Runx2 qui sont activés au début de l'ostéogénèse et sont essentiels pour la différenciation des ostéoblastes.

Les ARNs sont extraits à différents temps de culture puis transformés en ADNc par RT pour être utilisé en PCR quantitative. L'expression de ces gènes a été étudiée.

L'analyse de l'expression génique a été réalisée à partir des cellules MC3T3 cultivées en monocouche suivant une cinétique de J1, J7, J10 et J14 dans le milieu α MEM en présence des différents extraits Ln, Lc, Br et Bm avec du AA et du β -GP de J1, J7, J10 et J14 (Fig.99). Les six conditions contenues dans le milieu sont décrites en (A.I.).

Tous les points sont comparables les uns par rapport aux autres, car ils ont tous été normalisés par rapport au point J1 du contrôle négatif, afin d'observer l'évolution au cours du temps du phénotype ostéoblastique.

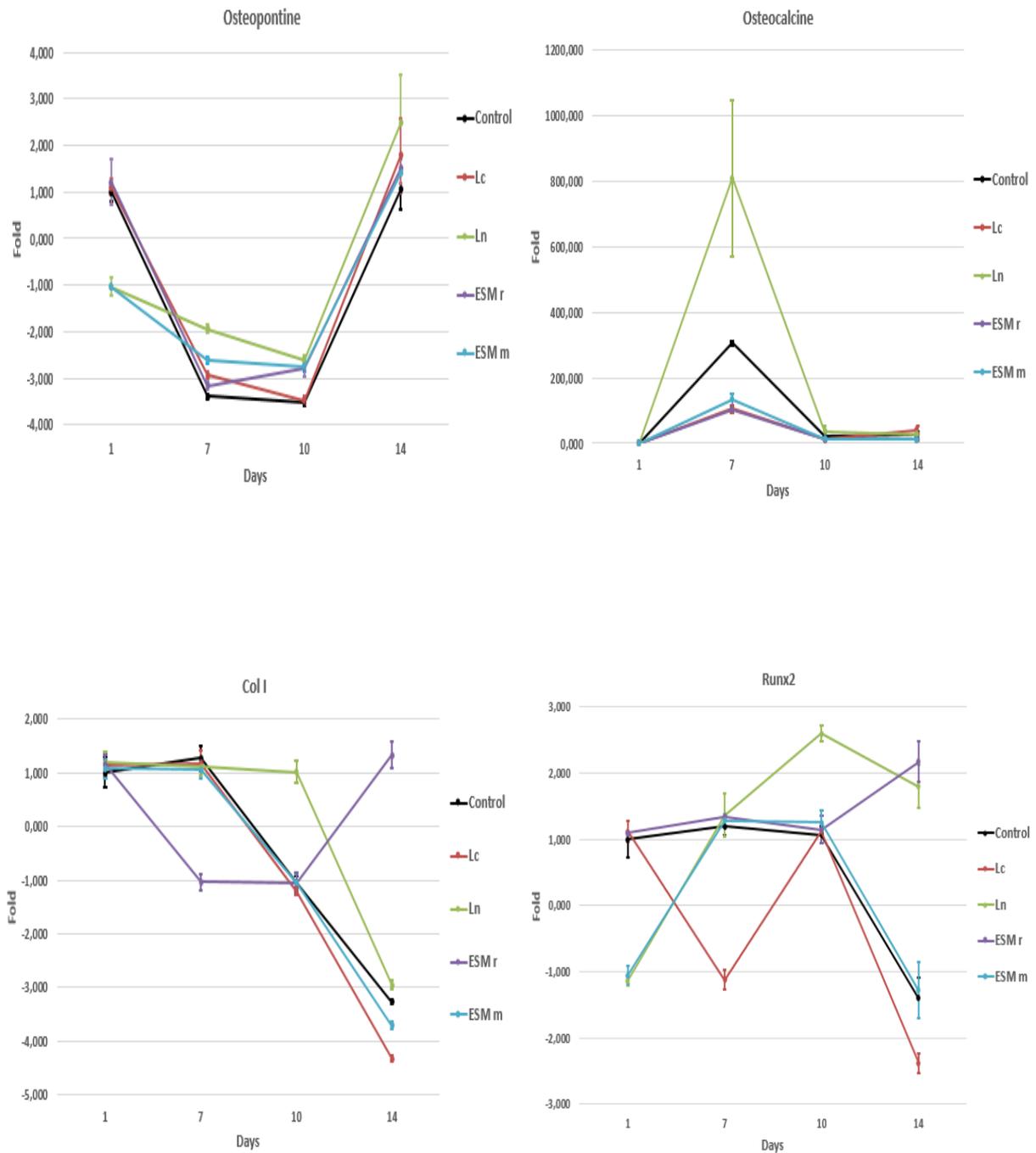


Figure 99. Effets des lipides sur l'expression génique des Ostéocalcine, Ostéopontine, Col I et Runx2 des MC3T3 traités durant 14 jours. RP29 a été utilisé comme gène de ménage. Les calculs de « fold » sont réalisés avec les valeurs du contrôle à J1.

L'expression de l'ostéopontine est inhibée du premier au septième jour de culture ensuite elle devient stable jusqu'à J10 puis une augmentation visible de J10 à J14 en présence des différents extraits. Les pics d'expression se visualisent successivement comme suit Ln, Lc, Br et Bm. Les différents extraits suivent la même évolution au cours du temps surtout Lc et Br la même évolution que le contrôle et Ln et Bm suivant la même évolution.

L'expression d'ostéocalcine est la même en présence des différents traitements Ln, Lc, Br et Bm suivant la même évolution au cours de la cinétique de culture.

Si on compare l'activité d'ostéocalcine des quatre extraits on observe pour Ln une nette augmentation de l'activité de l'ostéocalcine supérieure à celle des 3 autres extraits qui visualisent la même évolution par leur inhibition par rapport au contrôle.

L'ostéocalcine est exprimée d'une manière précoce du J1 à J10. Il s'agit peut-être de la différenciation des cellules en ostéoblastes.

L'expression du gène Run X 2 est augmentée à partir de J10 suite au traitement par Ln en comparant au contrôle, ESMm et au Lc. Ils induisent une augmentation rapide de l'expression de Runx2, visible dès le premier jour de traitement et persistant jusqu'à après 10 jours. Aucune inhibition de cette expression n'est observée dans les cellules en présence de Ln. De même, une augmentation de l'expression de RunX2 est observée dès 10 jours en présence de ESMr. Par contre on observe une inhibition en présence de LC et ESMm.

En ce qui concerne l'extrait ESMr, les marqueurs de la prolifération cellulaire, de l'activité du taux de collagène Col I indiquent que les cellules entrent en phase de différenciation à J10. Il se peut que ESMr stimule une entrée en phase de différenciation à J10. En effet, des dépôts minéralisés sont déjà observables à J7. Par contre l'expression du Col I est inhibée sous le traitement de LN, LC et Bm en les comparant avec le contrôle.

A.III. Discussion

Dans un premier temps une étude utilisant de la culture cellulaire, de l'histologie et la biologie moléculaire a été menée sur des cellules chondrogéniques les ATDC5 en présence des lipides de la nacre et de la chair de deux espèces de pinctadines différentes *radiata et margaritifera*. Des expériences *in vitro* ont ensuite été conduites afin d'évaluer l'activité des extraits sur des cellules précurseurs des ostéoblastes (les pré-ostéoblastes MC3T3). Nous

avons comparé l'effet de Br avec celui de Bm. Son effet est proche de ce dernier sur lequel des travaux antérieurs ont été effectués par Rousseau *et al.* (2008).

Les tests pratiqués sur les différents types cellulaires mettent clairement en évidence un pouvoir ostéogénique des quatre extraits (LN, LC, Br et Bm). Les expressions des collagènes sont visibles et tout à fait concordantes avec une différenciation ostéoblastique (Owen *et al.*, 1990).

Les résultats montrent que l'ostéopontine (OPN) est exprimée plus tardivement. De façon plus précise, l'étape de minéralisation se traduit par la synthèse d'ostéocalcine associée à d'autres protéines matricielles comme l'ostéopontine. L'ostéopontine a déjà été décrite comme étant impliquée dans le remodelage osseux (Rittling *et al.*, 1998; Duvall *et al.*, 2007). L'OPN joue un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire (Pampena *et al.*, 2004), ainsi que sur la minéralisation de la matrice extracellulaire produite dans les cultures cellulaires *in vitro* (Speer *et al.*, 2005).

De plus, on constate une expression dose-dépendante de ces marqueurs. Cependant seul l'extrait Ln induit la minéralisation des pré-ostéoblastes et induit une surexpression de l'ostéocalcine. L'ostéocalcine est l'un des derniers marqueurs de la différenciation des cellules en ostéoblastes. En effet, elle est exprimée uniquement par les ostéoblastes différenciés (Kasugai *et al.*, 1991) lors de la phase de minéralisation (Owen *et al.*, 1990). Il a été montré que des souris dont le gène codant pour l'ostéocalcine a été invalidé, présentent une augmentation progressive de la masse osseuse, et un contenu minéral osseux plus élevé que les animaux sauvages (Boskey *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1997 et Ducy *et al.*, 1996). L'ostéocalcine agirait sur la formation osseuse en contrôlant l'activité des ostéoblastes et comme inhibiteur de la minéralisation (Hunter *et al.*, 1996).

De plus l'expression du gène de l'*Ostéocalcine* présente une augmentation à J7 suite au traitement par Ln puis L'ostéocalcine stable à J14. La difficulté de quantification de ce marqueur a déjà été constatée dans d'autres études (Pereira-Mouries, 2003).

L'expression du gène *Runx2* est augmentée à partir de J10 suite au traitement par Ln en comparaison au contrôle et Lc.

Nous avons étudié le rôle des extraits surtout Ln dans l'induction de facteurs de transcription

ostéogénique Runx2 constitue le gène maître de la différenciation ostéoblastique, qui est activé au début de l'ostéogénèse et est essentiel pour la différenciation des ostéoblastes (Komori, 2010; Nakashima *et al.*, 2002) comme pour l'expression et l'activation de l'ostéocalcine (Ducy *et al.*, 1997).

Ces différents extraits induisent dans cette étude une stimulation complète de ces cellules jusqu'au stade de cellules qui minéralisent.

Ici, les extraits montrent une stimulation de la production des marqueurs de la différenciation ostéoblastique accélérée par rapport aux inducteurs standards. Ceci a également été constaté pour les dépôts minéralisés qui apparaissent dès 7 jours pour les cellules MC3T3 alors que dans la littérature, les dépôts des cellules souches sont normalement observés après 18 jours (Hanada *et al.*, 1997) tandis que les cellules MC3T3-E1 nécessitent 21 jours (Sudo *et al.*, 1983). Des dépôts minéralisés sont observés dès 7 jours de culture. Il s'agit là d'une accélération considérable du processus de minéralisation, puisque les cellules MC3T3-E1 ne minéralisent normalement qu'après 3 semaines (en présence d'inducteurs) (Sudo *et al.*, 1983).

Dans ce travail, les minéralisations ont été colorées au rouge Alizarine afin de visualiser les dépôts de calcium. En effet, les MC3T3 en présence de Lc et Ln minéralisent en fonction de la cinétique et nous visualisons des dépôts calciques à J14 également au niveau de *ESMB P.radiata* et surtout *P.margaritifera*. En effet, l'augmentation de minéralisation est proportionnelle à l'intensité de la coloration rouge.

Ainsi avec les différents tests nous avons pu démontrer la stimulation par les lipides de la chair de *Pinctada radiata* et les extraits ESM de *Pinctada radiata* et *Pinctada margaritifera* de la minéralisation et l'ostéogénèse en utilisant les deux types de cellules : ATDC5 préchondrogéniques qui reproduisent une partie du processus d'ossification endochondrale et les préostéoblastes MC3T3 qui entrent dans le processus d'ossification membranaire et donc d'ostéogénèse.

Rapelons que la nacre est sécrétée par le manteau de l'huître perlière de *Pinctada*, une étude précédente a été réalisée sur des molécules présentes dans la nacre pour évaluer leur effet sur une lignée pré-ostéoblastiques de souris (lignée MC3T3-E1). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que les extraits de nacre solubles dans l'eau stimulent la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation de la matrice (Wang *et al.*, 2011).

Les molécules de la nacre ont induit une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et ont induit la formation de nodules osseux. Les molécules présentes dans la nacre de *Pinctada radiata* stimulent rapidement les premières étapes de la différenciation osseuse en activant l'expression de *Runx2* et de *Col I* puis induisent les étapes tardives en activant la transcription de l'ostéopontine, qui est une protéine d'adhérence du tissu osseux, et la formation de matrice extra-cellulaire. Ce résultat est similaire avec les molécules de nacre de *Pinctada margaritifera* sur lequel une étude a été faite par Rousseau *et al.* en 2007. L'étude des lipides de la nacre et de la chair est une première.

D'autres études montrent la présence des molécules actives sur l'ostéogénèse dans l'extrait hydrosoluble de la matrice organique de la nacre de *Pinctada* et est confirmée *in vitro* sur les cellules formatrices d'os ainsi que sur leurs précurseurs : des cellules stromales de la moelle osseuse (rat), des fibroblastes (humains) et des ostéoblastes (murins) à différents stades de maturation (Lopez *et al.*, 1992; Pereira-Mouries *et al.*, 2002). Les résultats obtenus montrent que le potentiel ostéogénique des molécules signaux stockées dans la matrice organique de la nacre s'exprime sur des cellules de la lignée osseuse, des cellules souches d'ostéoblastes et sur des fibroblastes lors de leur recrutement (Milet *et al.*, 2004).

Ces extraits testés sur les deux types de cellules peuvent stimuler les cellules osseuses et cartilagineuses. Ces résultats sont proches de ceux de Moutahir-Belquasmi *et al.*, (2001), qui ont montré que les molécules extraites de la nacre sont reconnues par les cellules du squelette, du cartilage et par les cellules de la peau. Sachant qu'appliqués à des explants de peau, les lipides de la nacre de *Pinctada margaritifera* favorisent la restauration du stratum corneum. Les propriétés de signalisation des lipides de nacre pourraient être utilisées pour un développement de nouveaux traitements contre les symptômes de la dermatite (Rousseau *et al.*, 2006).

Les molécules présentes dans la nacre peuvent réguler le métabolisme osseux et peuvent également participer à la réparation des déficits osseux. La matrice organique de la nacre a la

faculté d'induire la stimulation des cellules osseuses et cartilagineuses, ainsi que de leurs précurseurs pour réparer et entretenir le capital osseux. Avec les deux types de cellules les différents extraits induisent l'activation des protéines ou marqueurs des gènes spécifiques du tissu osseux. Mais l'expression de ces protéines va être différente dans un modèle de réparation intramembranaire ou endochondrale et va permettre d'orchestrer les événements conduisant au rétablissement d'un os mature (Jingushi *et al.*, 1992).

A la fin de cette discussion, nous documentons le rôle des lipides dans la biologie osseuse, et les relations entre les acides gras et d'autres facteurs qui influent sur le métabolisme osseux.

De ce fait rappelons que les AGPI 20:4n-6, 20:5n-3 et 22:6n-3 sont considérés comme des acides gras essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des espèces marines (Trider and Castell, 1980; Uki *et al.*, 1986). Les lipides de la chair de *Pinctada radiata* figurent parmi ceux qui sont riches en AGPI (chapitre R et D I).

Les principaux AGPI n-3 étant l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20:5n-3) et le DHA (acide docosahexaénoïque, C22:6n-3) (Bourre, 2004). Plusieurs auteurs ont signalé la richesse des bivalves en EPA et DHA (Freites *et al.*, 2002 ; Murphy *et al.*, 2002 ; Orban *et al.*, 2002 ; Su & Dinh, 2003 ; Zlatanov, 2008).

Ces acides gras possèdent un rôle crucial dans la nutrition et la santé humaine. En effet, ils sont impliqués dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires (Hu & Willett, 2002 ; Harris & Von Schacky, 2004), possèdent des propriétés anti-inflammatoires et immunitaires (Calder & Grimble, 2002 ; Gil, 2002 ; Simopoulos, 2002) et jouent un rôle inhibiteur dans le développement de certains cancers tels que le cancer du sein, du colon et de la prostate (Leitzmann *et al.*, 2004 ; Roynette *et al.*, 2004 ; Binukumar & Mathew, 2005 ; Moyad, 2005 ; Judé *et al.*, 2006)

Néanmoins, il existe des variations selon les espèces, au niveau de l'individu entier, et au niveau des organes différenciés (Vaskovsky, 1989; Kostetsky and Velansky, 2009). Les facteurs qui influencent la composition en phospholipides peuvent être endogènes (sexe, reproduction) ou exogènes (salinité, température, saison, nutrition) (Vaskovsky, 1989).

On suppose que ce phosphosphingolipide CAEP (céramide aminoéthylphosphonate) sous classe de PE remplace la sphingomyéline (se trouve dans le tissu nerveux) chez les invertébrés, même si certains mollusques semblent posséder les deux (Vaskovsky, 1989).

Au niveau subcellulaire, les plasmalogènes seraient plutôt concentrés dans la membrane plasmique, mais ils ont aussi été mis en évidence dans le réticulum endoplasmique, dans les membranes externe et interne des mitochondries et dans la membrane du noyau (Daum, 1985; Wolff *et al.*, 1987).

Ces plasmalogènes sont trouvés majoritairement dans la PE et dans une moindre mesure dans la PC. Ils sont également importants dans la PS chez les mollusques, qui sont les seuls organismes à en contenir (Vaskovsky, 1989) Les acides gras et leurs métabolites comme les prostacyclines régulent l'expression d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de multiples facteurs de transcription (Guesnet *et al.*, 2005).

Les fonctions des acides gras semblent être variées. A cet égard ils sont abondants au niveau des phospholipides membranaires des différentes cellules dont ils conditionnent leur fluidité (blond, 1993). En effet, la fluidité des membranes biologiques est contrôlée par la structure des lipides qui les composent, et plus particulièrement par la nature et la quantité de leurs acides gras poly-insaturés. Plus déformables, elles s'insinuent mieux dans les microvaisseaux.

Les lipides du tissu osseux sont plus riches en phospholipides que ceux de la moelle osseuse correspondante. L'examen des compositions en acides gras montre que les pourcentages d'acides gras saturés sont plus faibles dans la moelle épinière (34,3 %) que dans les moelles osseuses (49 à 60 % selon l'origine). Les différences les plus remarquables entre moelle épinière et moelles osseuses concernent d'une part les acides gras saturés et mono-insaturés à chaînes très longues (AGTLC), d'autre part les diméthylacétals (DMA).

Les AGTLC constituent 26,7 % des acides gras de la moelle épinière ; il s'agit des acides 20:1 (9,3 %), 24:0 (3,6 %) et 24:1 n-9 (8,4 %) ; on trouve également les acides 20:0, 22:0, 22:1 et 23:0. Ces acides gras sont caractéristiques de la sphingomyéline et des cérébrosides, lipides polaires du tissu nerveux. Comme attendu, la moelle osseuse, dépourvue de cette catégorie de lipides, contient peu d'AGTLC (0,3 et 0,7 % respectivement pour la moelle des os longs et plats de bœuf ; 1,83 % pour la moelle des os longs de porc). On remarque que le tissu osseux, quelle que soit son origine, contient très peu d'AGTLC (de 0,3 à 0,5 %) (Combe *et al.*, 2002).

Cette forme activée réagit avec l'inositol pour former la PI. La PC et la PE peuvent être synthétisés par une voie qui utilise la choline (alimentaire) et l'éthanolamine. La PS provient d'une réaction directe entre la PE ou la PC et la sérine.

La PE peut être reformée par décarboxylation de la PS. La PC peut être également formée à partir de la PE par transméthylation.

Les mollusques bivalves peuvent utiliser la biosynthèse *de novo*, mais ils ne seraient pas capables de décarboxyler la PS en PE (Shieh, 1968). Chez eux, la synthèse des glycérolipides se fait plutôt par le biais de transacylation à partir des lipides alimentaires que par biosynthèse *de novo* (Parker and Selivonchick, 1986).

Les lipides sont des constituants importants de la cellule dont la dégradation libère une grande quantité d'énergie. Ils constituent, en outre, l'élément architectural de toutes les membranes cellulaires (Fain- Maurel, 1994). De nouvelles preuves soutiennent l'idée que les acides gras alimentaires et les antioxydants peuvent atténuer l'activité ostéoclastique et réduire la gravité des maladies ostéolytiques des os et des articulations (Seifert & Watkins, 1997).

Les résultats obtenus sur membranes biologiques sont plus controversés, probablement en raison de leur complexité et de leur variabilité (Mitchell, & Litman, 1998 ; Stillwell, & Wassall, 2003). Toutefois, nombre de travaux réalisés sur bicouches lipidiques *in vitro* ou *in vivo* indiquent qu'un enrichissement en AGPI, en particulier en DHA, induirait une augmentation de la perméabilité membranaire due à une diminution du caractère compact de la membrane (Mitchell, & Litman, 1998 ; Stillwell, & Wassall, 2003).

Tout comme les autres métabolites (sucres, protéines,...) les lipides présentent un intérêt potentiel dans tous ces domaines et particulièrement dans le secteur de l'activité biologique. Ainsi, Watkin *et al.* (2001) décrivent un aperçu des activités des lipides et des acides gras sur la biologie et les fonctions cellulaires des os. De part ses particularités et notamment la richesse en AGPI, le milieu marin constitue une source intéressante de lipides bioactifs.

Les produits actifs composés correspondent à des médicaments qui, complexés avec des lipides, voient leur activité augmenter. Les n-3 peuvent aussi intervenir dans le traitement des inflammations dues à l'asthme, l'arthrite, les migraines, le diabète, les fonctions immunes et

le psoriasis (Kinsella, 1988 ; Bajpai & Bajpai, 1993). Des effets bénéfiques cohérents et reproductibles d'acides gras oméga-3 (n-3) des acides gras sur le métabolisme osseux et des os. Les acides gras polyinsaturés modulent la biosynthèse des eicosanoïdes dans de nombreux tissus et types cellulaires, altèrent la transduction du signal, et influencent l'expression des gènes (Watkins *et al.*, 2001).

Parmi les n-3, le DHA est incorporé rapidement en priorité au niveau des phospholipides de la membrane plasmique et des membranes mitochondriales (Stillwell & Wassall, 2003). Cet enrichissement n'est pas uniforme dans toutes les classes de PL. À titre d'exemple, l'addition de DHA dans le milieu de culture de cellules tumorales conduit à une incorporation préférentielle du DHA dans la PE, dans une moindre mesure dans la PC et enfin minoritairement dans les autres classes de phospholipides (Robinson *et al.*, 1993 ; Stillwell & Wassall, 2003). Dans de nombreuses cellules, la PE, concentrée dans le feuillet interne de la membrane plasmique, semble être le premier « récepteur » du DHA (Stillwell, & Wassall, 2003). Malgré tout, dans certaines membranes et en particulier les membranes synaptiques, le DHA est préférentiellement incorporé dans la PS.

La nacre est riche en acides gras polyinsaturés de la série n-3 et particulièrement dans les catégories de la PC et PE (voir R et D Ch II) de ce fait nous pouvons supposer que ces n-3 jouent un rôle majeur dans l'intégration de l'extrait de la nacre et de la chair sur les deux types de cellules préostéoblastiques et préchondrogéniques.

Le rôle structural du DHA peut également intervenir au niveau de la signalisation cellulaire. Dans des études *in vitro*, il a été montré que le DHA et l'EPA répriment l'expression des cytokines inflammatoires (TNF, IL) et également l'expression de gènes dans le processus d'inflammation (NF B, PPAR) (Calder, 2008).

Comme l'a montré Lauritzen *et al.* (2001) sur une étude de la rétine et du cerveau, le taux de DHA est élevé dans les PE de la nacre et plus élevé que celui dans la chair. Cette concentration élevée en DHA, caractéristique du système nerveux des mammifères, est particulièrement marquée au niveau de certaines classes de phospholipides (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) constituant les membranes des cellules nerveuses et rétiniennes (Lauritzen *et al.*, 2001).

Ainsi la conversion du 18:3n-3 en 22:6n-3 serait limitée au niveau du passage du 22:5n-3 en 22:6n-3, et on peut vérifier cela en utilisant les précurseurs (18:2n-6 et 18:3n-3) radiomarqués donnés à des doses physiologiques d'en étudier les étapes limitantes et de vérifier la bonne incorporation dans les phospholipides membranaires des AGPI dérivés.

Selon Lauritzen *et al.* (2001) l'incorporation du DHA est optimale dans les membranes tandis que l'AA néo-synthétisé est préférentiellement incorporé dans les membranes cellulaires or le DHA provient de la synthèse de C18 :3n-3. Il se peut que la richesse de la nacre, en C18 en particulier les acides linoléique (18:2n6) et linoléique (18:3n3), se traduit par les précurseurs et font la conversion au niveau des cellules. Ainsi la conversion du 18:3n-3 en 22:6n-3 serait limitée au niveau du passage du 22:5n-3 en 22:6n-3, selon Lauritzen *et al.* (2001).

Le métabolisme des AGPI a été étudié dans les différents types cellulaires cérébraux en utilisant les précurseurs (18:2n-6 et 18:3n-3) radiomarqués donnés à des doses physiologiques.

Également les n-6 jouent un rôle important tant sur le plan alimentaire que sur la santé et c'est en rapport avec les n-3 se traduisant par le rapport recommandé. Ainsi parmi les oméga 6, l'acide arachidonique L'AA (C20:4, n-6) est le précurseur d'une famille de molécules régulatrices, les eicosanoïdes, qui exercent leurs effets localement de façon autocrine, sur la cellule sécrétrice, ou paracrine, sur les cellules adjacentes (Samuelsson, 1987). En plus de leur rôle structural, les acides gras essentiels présentent un rôle biologique puisque l'acide arachidonique. C20:4(n-6) est un précurseur des eicôsanoïdes comme les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les lipoxines. Les eicôsanoïdes participent à de multiples fonctions de régulation et d'interrelation dans la cellule (Pascaud et Brouard, 1991).

Les eicosanoïdes comprennent les thromboxanes (THX), les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT). Toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, produisent ces facteurs à partir de l'AA et minoritairement à partir de son précurseur l'acide dihomom- γ -linoléique (C20 :3n-6). De nombreuses études épidémiologiques soulignent le potentiel protecteur de l'EPA dans les maladies inflammatoires (Serhan *et al.*, 2004),

L'EPA n'est pas un compétiteur fort de l'AA et n'est qu'un précurseur mineur de certains eicosanoïdes parmi lesquels les PG3 et les LT5 qui présentent un rôle de régulation du processus inflammatoire. En revanche, de récentes analyses ont montré que cet AG est à

l'origine d'une famille de molécules bioactives capables d'intervenir dans la résolution des processus inflammatoires, les résolvines (*resolution phase interaction products*) (Hong *et al.*, 2003, Marcheselli *et al.*, 2003 & Serhan *et al.*, 2004). Ces métabolites bioactifs seraient à l'origine de l'effet bénéfique sur la santé observé dans les études ayant inclus une supplémentation nutritionnelle des patients en n-3 (Hong *et al.*, 2003).

Plusieurs organisations internationales de santé ont fixé un rapport idéal des AGPI (n-6/n-3) comme par exemple le ministère britannique de la Santé qui recommande un rapport de 4:1, au maximum (HMSO, 1994). Le comité d'experts FAO/WHO (1994), à son tour, a proposé un intervalle compris entre 5 :1 et 10 :1. L'ANC France (2000) a également fixé un rapport de 5 :1 qui est équivalent à 2,25 g/jour d'AGPI (n-3).

Un rapport oméga 6 / oméga 3 plus élevé était significativement associé à une DMO(densité minérale de l'os) plus faible. Parmi les différents résultats, l'association la plus forte a été observée en ne prenant en compte que le rapport acide linoléique (oméga 6)/ acide alpha-linolénique (oméga 3). Le rapport oméga 6/oméga 3 était de 8,4 chez les hommes et de 7,9 chez les femmes qui sont atteintes d'ostéoporose (Weiss *et al.*, 2005).

Les acides gras poly-insaturés semblent être des facteurs de risque d'ostéoporose modifiables. Les experts suggèrent que deux phénomènes concomitants doivent changer pour diminuer le risque : l'augmentation de la consommation des aliments sources d'oméga 3 et la diminution des apports en oméga 6. Des essais cliniques randomisés restent cependant nécessaires pour tester les effets des acides gras sur l'os. Mais si la supplémentation en acides gras poly-insaturés (Oméga 3) était efficace sur l'ostéoporose, cela pourrait constituer un moyen de prévention sûr et bon marché (Weiss *et al.*, 2005).

Les lipides de nacre pourraient jouer un rôle incontestable dans cette stimulation. Rappelons que la nacre est formée de carbonate de calcium capable de pouvoir ostéogénique. En traitant seulement avec les lipides de la nacre, nous avons pu montrer avec cette étude le pouvoir ostéogénique des extraits de la nacre sachant que les phospholipides sont les lipides qui entrent le plus dans la formation de la membrane cellulaire.

GPR40 est un récepteur protéique transmembranaire sur lequel certains acides gras viennent se fixer, ce qui engendre un signal cellulaire GPR40 (fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G). En effet, (Wauquier *et al.*, 2014) avaient montré que le récepteur lipidique GPR40 joue un rôle clef dans la protection du squelette, en maintenant la densité minérale osseuse. GPR40, un récepteur aux acides gras, a été découvert sur la membrane des cellules osseuses impliquées dans le remodelage osseux. Wauquier *et al* (2014) ont découvert qu'il était aussi localisé sur la membrane de cellules osseuses impliquées dans le remodelage osseux : les ostéoclastes. Ils ont mis en culture des cellules de moelle osseuse, de manière à isoler les ostéoclastes et leurs précurseurs cellulaires. Lorsque les récepteurs GPR40 de ces cellules sont stimulés, la différenciation cellulaire des ostéoclastes est inhibée. L'os est donc moins résorbé, ce qui freine la perte osseuse. Afin d'avoir des spécificités de composition en AG particulières, qui pourront être à l'origine de l'intégration des extraits lipidiques de la nacre aux différentes cellules.

Conclusions et perspectives

Dans cette thèse nous avons fait l'étude des lipides totaux, des catégories lipidiques (PC, PE, PS et PI), utilisés comme complément alimentaire, étant donné leur richesse en AGPI en particulier en EPA et DHA ainsi que celle de la nacre comme biomatériau potentiel implantable chez l'homme.

Dans une première partie afin de valoriser l'huître perlière *Pinctada radiata* qui colonise les côtes tunisiennes, nous avons exclu l'étude des lipides neutres de notre étude sur cette espèce vu notre objectif de visualiser surtout son profil en lipides polaires constituant majeur de la membrane cellulaire.

Nous avons dégagé ainsi les conclusions suivantes :

La nacre et la chair de l'huître perlière *P. radiata* ont le même profil en acides gras des lipides totaux et des lipides polaires avec des proportions différentes.

Nous avons vu dans le cas idéal, un suivi saisonnier pour comparer les profils d'acides gras pour les lipides totaux et des profils d'acides gras pour chaque classe de lipide. Une étude préliminaire semblait donc indispensable avec les acides gras totaux afin de déterminer la similarité entre la nacre et la chair.

L'étude menée sur la chair et la nacre de *Pinctada radiata* a montré que les profils des lipides totaux permettaient de discriminer la nacre de la chair. Puis, les comparaisons entre les profils d'acides gras des phospholipides ont mis en évidence quelques différences (conséquences de l'appartenance des lipides polaires dans les lipides totaux).

Différentes analyses statistiques sur l'ACP ont été effectuées afin d'observer les similitudes ou les dissemblances entre les profils lipidiques de la nacre et de la chair.

Il en ressort que l'analyse présentant le meilleur compromis précision/limites de la collection de références était l'analyse en composante principale (ACP).

La qualité de la nacre ainsi que les analyses biochimiques ont montré que la meilleure localisation en Tunisie loin des zones portuaires et des différents stress (la pêche, l'exploitation, zone touristique etc...) est la zone de Maharés étant donné sa bonne qualité en terme d'épaisseur.

L'huître perlière *P. radiata* peut être utilisée comme complément nutritionnel par sa chair, vu sa richesse en acides gras polyinsaturés notamment en oméga 3 et en oméga 6 et peut être utilisée comme biomatériau potentiel de substitution osseuse par l'intermédiaire de sa nacre.

L'objectif de cette thèse était de démontrer la qualité de la nacre, le pouvoir ostéogénique des lipides de la nacre ainsi que ses molécules ESM et les lipides de la chair, l'effet bénéfique des lipides totaux de la chair en particulier les AG de la série n-3 (EPA +DHA) ainsi que sur la santé osseuse. Pour répondre à cette problématique, nous avons mis en place des modèles d'études *in vitro*. Au cours de ces travaux, nous avons démontré que :

Les MC3T3 et les ATDC5 peuvent être efficacement différenciées *in vitro* après stimulation par des facteurs ostéogéniques ajoutés au milieu de culture et sous le traitement des lipides de la nacre et de la chair ainsi que l'extrait ESM de la nacre de *Pinctada radiata* et l'ESM de *Pinctada margaritifera*.

Ils induisent l'engagement des cellules MC3T3 vers le lignage ostéoblastique par l'activation des promoteurs des gènes spécifiques du tissu osseux, tels que: le collagène de type 1, l'ostéocalcine (OC), l'ostéopontine(OP) et le Runx2.

Ils induisent l'engagement des cellules ATDC5 vers la différenciation endochondrale par l'activation des promoteurs des gènes spécifiques du tissu osseux, tels que: le collagène de type 1 alpha-1 (Col1a1), l'Aggrécane et le collagène de type X alpha-1 (ColXA1).

Les molécules présentes dans la nacre stimulent rapidement les premières étapes de la différenciation osseuse en activant l'expression de *Runx2* et de *Col I* puis induisent les étapes tardives en activant la transcription de l'ostéopontine, qui est une protéine d'adhérence du tissu osseux, et la formation de matrice extra-cellulaire.

Nous remarquons que la fraction organique ou ESMr, en comparaison avec celle de *Pinctada margaritifera*, a conservé les propriétés stimulantes de la nacre et la stimulation est même beaucoup plus importante. Les résultats permettent de démontrer l'activité biologique de la fraction organique de la nacre de *Pinctada radiata* tout comme *Pinctada margaritifera* qui contient des molécules signal ayant conservé un réel potentiel d'action chez l'Homme.

Parallèlement les précurseurs ostéoblastiques (pré-ostéoblastes) sont activés et se différencient en ostéoblastes. Ces molécules organiques Br ont ainsi été extraites et ont démontré une stimulation des marqueurs de la différenciation des ostéoblastes.

Les acides gras de la nacre à eux seuls susceptibles de fournir un environnement dynamique de culture, induisant la différenciation endochondrale avec la calcification pour les ATDC5 et la différenciation ostéoblastique conduisant à la minéralisation pour les MC3T3.

La nacre riche en AA (C20 :4n-6) et en EPA (C20 :5n-3), ses phospholipides pourraient intervenir dans la fonction endocrine ostéogénique de la nacre et sa formation. Les protéines environnantes de la membrane cellulaire jouent également un rôle important dans ce processus ce qui s'est traduit par le succès de l'extrait étudié.

La nacre pourrait également jouer un rôle important du côté biomatériau de comblement osseux par ses molécules ESM. Ses acides gras pourraient jouer un rôle préventif des pathologies de l'os. Ainsi la matrice organique isolée de la nacre peut donc induire la stimulation des cellules osseuses et cartilagineuses; elle peut même induire la stimulation de leurs précurseurs non seulement pour réparer ou entretenir ces tissus mais aussi pour aboutir à la formation finale de tissus physiologiquement sains et actifs. Elle est biocompatible et ostéogénique.

Par ailleurs, il est à remarquer que quel que soit le type de nacre des pinctadines, sa biocompatibilité et son ostéogénie sont excellentes puisqu'ils ont montré les propriétés ostéoinductrices de ces extraits. En plus la nacre de *Pinctada radiata* est disponible et peu coûteuse. Pourtant, la quantité nécessaire à son utilisation semble infinitésimale au regard de l'inépuisable réservoir de substances naturelles d'intérêt biologique que constituent les milieux marins des côtes tunisiennes.

Nous rappelons également que les acides gras des familles n-3 et n-6 sont apportés par l'alimentation ; or parfois les antalgiques et les anti-inflammatoires ne présentent pas une solution efficace pour lutter contre les maladies de l'os, d'où l'importance d'une nutrition complétée en oméga 3 soit par compléments alimentaires soit par solution buvable de poudre de nacre.

L'évaluation des applications pharmaceutiques potentielles de ces acides gras devra être réalisée sur le maintien du statut minéral osseux et le contrôle osseux.

L'utilisation des propriétés des molécules de nacre peut être envisagée dans les cas de traumatismes osseux ou de pathologies provoquées par une perturbation dans la régulation de la croissance endochondrale de l'os conduisant à des anomalies comme le nanisme, des difformités du squelette ou prédisposant à des maladies comme l'arthrose.

Une fois les voies actives identifiées, il est conseillé de s'orienter vers le ou les facteurs potentiellement « responsables » des effets de l'ESM et aussi identifier le/les récepteurs membranaires susceptibles d'être activés et de relayer les effets de la nacre et l'activation des voies de signalisation. En fonction des voies activées, il est possible d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces voies, afin de confirmer que les effets de l'ESM sont bien dépendants de ces dernières. A long terme, une fois les molécules actives identifiées, la création d'un biomatériau implantable à l'homme sera envisageable avec la possibilité d'utiliser le principe pro minéralisant pour l'os et le principe pro-chondrogénique pour le cartilage ou même sur des cellules souches afin d'aider leur différenciation en cellule chondrocytaire dans le cas de biothérapie du cartilage.

Les tests menés sur les cellules osseuses au cours de cette thèse ont été réalisés dans un but exploratoire. Désormais, les molécules associées à la calcification des coquilles ont démontré leur pouvoir ostéogène : elles stimulent la formation osseuse. Il sera nécessaire de poursuivre ces expériences dans le but d'identifier les molécules responsables des différents processus que nous avons observés.

Les lipides semblent jouer un rôle incontestable dans cette stimulation. De plus, nous pouvons confirmer ce rôle en associant les molécules de nacre ou de biominéralisation avec les acides gras de la nacre et de la chair.

De plus, nous pouvons supposer qu'en associant les molécules de nacre ou de biominéralisation avec les acides gras de la nacre et de la chair dans les failles osseux à travers les sites actifs de l'os ou du cartilage humain présentant les différents pathologies osseuses. Nous pouvons trouver des solutions pour lutter contre le vieillissement et les pathologies de l'os. Il sera nécessaire donc de faire des essais sur la culture des cellules humaines et par la suite des tests *in vivo*. Mais un problème se pose : les Ln et Lc semblent toxiques à partir de certaines quantités à déterminer à partir de 500mg. Leur toxicité pourrait provenir de la méthode d'extraction. Il faudra peut être trouver une méthode de stérilisation

ou bien une méthode qui nous permettra d'éliminer les traces des solvants utilisés dans l'extraction à savoir le chloroforme, ...etc.

Il serait aussi intéressant de poursuivre ce travail de thèse. Il reste maintenant à préciser le mécanisme d'action de ces acides gras sur les cellules, en partant de l'hypothèse émise suite à notre travail. Nous n'avons pas quantifié certains éléments supplémentaires tels que les cytokines ou facteur de croissance (IL-6, IGF-1 etc) ou l'intervention d'autres gènes ou entrer dans les microdomaines des membranes cellulaires comme les drafts intervenant de loin ou de près dans le processus d'ostéogénie qui pourraient nous aider à identifier les mécanismes impliqués.

Il nous est permis également de penser que l'activité précoce de la minéralisation à J7 peut faire intervenir deux voies qui restent à vérifier :

- La production quantitative des molécules actives de la minéralisation en présence des acides gras de la nacre.
- Les récepteurs deviennent plus sensibles aux molécules bioactives de la nacre pour déclencher le processus de minéralisation d'une façon précoce.

De plus, il serait important d'identifier le ou les acides gras responsables des effets observés sur le métabolisme osseux. Les acides gras utilisés sont des mélanges lipidiques assez complexes dont nous ne connaissons pas la nature exacte, même si nous avons des informations générales. Connaître cette information permettrait de préciser le mécanisme d'action.

Références bibliographiques

A

Abad M., Ruiz C., Martinez D., Mosquera G. & Sanchez J.L., 1995. Seasonal variations of lipid class and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán, (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 108: 109-118.

Addadi L., Joester D., Nudelman F. & Weiner S., 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.*, 12: 980-987.

Adachi K., 1979. Seasonal changes of the protein level in the adductor muscle of the clam, *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) with reference to the reproductive seasons. *Camp. Biochem. Physiol.*, 64A: 85-89.

Adar S. & Kaufman F., 1991. A new class of potent antiproliferative glycolipids. *Chem. Phys. Lipids.*, 59: 255-61.

Ahn I. Y., Cho K. W., Choi K. S., Seo Y. & Shin J., 2000. Lipid content and composition of the Antarctic lamellibranch, *Laternula elliptica* (King and Broderip) (Anomalodesmata: Laternulidae), in King George Island during an austral summer. *Polar. Biol.*, 23: 24–33.

Akagawa Y., Hashimoto M., Kondo N., Yamasaka A. & Tsuru H., 1985. Tissue reaction to implanted biomaterials. *J. Prosth. Dent.*, 53: 681-684.

Alan Deidun, Fabrizio Gianni, David P Cilia, Alice Lodola & Dario Savini; 2014. Morphometric analyses of a *Pinctada radiata* (Leach, 1814) (Bivalvia: Pteriidae) population in the Maltese Islands. *J. Black Sea/Mediterranean Environment.*, v (20) 1:1-12.

Albrektsson T., 1985. The response of bone to titanium implants. *CRC Crit. Rev. Biocompatibility.*, 1: 53-55.

Alessandri J.M., Extier A., Langelier B., Perruchot M.H., Heberden C., Guesnet P., Lavialle M., 2008. Estradiol favors the formation of eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and n-3

docosapentaenoic acid (22:5n-3) from alpha-linolenic acid (18:3n-3) in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids*; 43 : 19-28.

Alford A.I., Hankenson K.D., 2006. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, 38:749-57.

Al-Madfa H .M., Abdel-Moati A. R. & Al-Gimaly F. H., 1998. "*Pinctada radiata* (pearl oyster): a bioindicator for metal pollution monitoring in the Qatari waters (Arabian Gulf)." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.*, 60 (2): 245-251.

Almatar S .M., Carpenter K. E., Jackson R., Alhazen S .H., Al-Sffar A. H ., Abdulghffar A .R. & Carpenter., 1993. Observations on the Pearl Oyster fishery of Kuwait. *J of Shellfish Res.*, 12(1): 35-39.

Almeida M.J., Milet C., Peduzzi J., Pereira L., Haigle J., Barthélemy M., Lopez E., 2000. Effect of water-soluble matrix fraction extracted from the nacre of *Pinctada maxima* on the alkaline phosphatase activity of cultured fibroblasts, *J. Exp. Zool.*, 288 (4): 327-334.

Anwar N.A., Richardson C.A. & Seed R., 1990. Age determination, growth rate and population structure of the horse mussel *Modiolus modiolus*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 70: 441-457.

Ackman R.G; 1995. Composition and nutritive Value of Fish and shellfish Lipids. *In A. Ruiter (Ed.), Fish and Fishery Products, UK: CAB International.* 117-156.

Aitken C.J., Hodge J.M., Nicholson G.C., 2004. Adenoviral down-regulation of osteopontin inhibits human osteoclast differentiation *in vitro*. *J Cell Biochem.*, 93:896-903.

Aloui Béjaoui N., 1998. Ecologie de la population des moules *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) du lac de Bizerte. Thèse de Doctorat en biologie, 246p. Univ. Tunis.

Amal Al-Saadi., 2013. Population structure and patterns of genetic variation in a pearl oyster (*Pinctada radiata*) native to the Arabian Gulf. Thesis of Science:122 P

ANC, **Apports nutritionnels conseillés pour la population française ; 2000.** AFSSA-CNERNA-CNRS. eds. TEC & DOC.

Andersson S., Nilsson B., Hessel T., Saraste M., Noren A., Stevens-Andersson A., Rydholm D., 1989. Degenerative joint disease in ballet dancers. *Clin Orthop.*, 238 : 233-236.

Ansell A.D & Trevallion A., 1967. Studies on *Tellina tenuis* Da Costa. I Seasonal growth and biochemical cycle. *J. Exp. Biol. Ecol.*, 1: 220-235.

Ansell A.D., 1972. Distribution, rate of growth and seasonal biochemical cycle of the bivalve *Donax vittatus* kames bay, Millports. *J Exp.Mar. boil. Ecol.*, 10:137-150.

Ansell S.D., 1974. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from the Clyde Sea area. *Mar. Biol.*, 25: 85-99.

Anselme K., 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.*, 21: 667-81.

Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Iost A. & Hardouin P., 2002. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res.*, 60: 529-40.

Ansell A.D., Sivadas P., 1973. Some effects of temperature and starvation on the bivalve *Donax virtatus* (da Costa) in experimental laboratory populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 13: 229-262.

Ackman R.G., 1995. Composition and nutritive Value of Fish and shellfish Lipids. In A. Ruitter (Ed.), *Fish and Fishery Products*, UK: *CAB International.*, 117-156.

Ackman R. G., Tocher C. S. & McLachlan J., 1968. Marine Phytoplankter Fatty Acids, *J. Fish. Res. Board Canada.*, 25:1603–1620.

Apte S.S., Seldin M.F., Hayashi M., Olsen B.R., 1992. Cloning of the human and mouse type X collagen genes and mapping of the mouse type X collagen gene to chromosome 10. *European Journal Of Biochemistry.*, vol. 206, p. 217-224.

Arnoult D., Petit F., Lelièvre J.D., Akarid K., Ameisen J .C. & Estaquier J., 2001. Le récepteur de la phosphatidyl-sérine, unintermédiaire entre apoptose et réponse immunitaire. *Médecine/Sciences.*, 17: 385-7.

Arthur G. & Bittman R., 1998. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1390 (1): 85-102.

Astorg P., Guesnet P., Alessandri J.M., Galan P., Lavalie M., 2006. Acides gras polyinsaturés et santé: aperçu des connaissances actuelles. *Sciences des Aliments*, 26: 8-28.

Atlan G., Balmain N., Berland S., Bernadetti V. & Lopez E., 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie. Life Sciences.*, 320: 253-258.

Atlan G., Delattre O., Berland S., Le Faou A., Nabias G., Cot D. & Lopez E., 1999. Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials.*, 20: 1017-1022.

Atsumi T., Miwa Y., Kimata K., Ikawa Y.A ., 1990. Chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ. Dev.*, 1990, 30 : 109-16.

Azouz A., 1971. Etude des biocoenoses benthiques et de la faune ichthyologique des fonds chalutables de la Tunisie régions N et SE. Thèse Doct. Etat, Caen, C.N.R.S., Ao 6472, 243 p.

Augello A. & De Bari C., 2010. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.*, 21:1226-38.

Aursand M., Bleivik B., Rainuzzo J.R., Jorgensen L. & Mohr V., 1994. Lipid distribution and composition of commercially farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Scinces Food and Agriculture.*, 64: 239-48.

B

Babbush Ca., 1972. Endosseous blade-vent implants: a research review. *J. Oral Surg.*, 30: 168-173.

Bachle M. & Kohal R. J., 2004. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res.*, 15: 683-92.

Bajpai P.& Bajpai P.K., 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a revue. *J. Biotechnology.*, 30: 161-83.

Ball M., Grant D.M, Lo W.J. & Scotchford C.A., 2008. The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A.*, 86:637-47.

Barash A. & Danin Z., 1972. The Indo-Pacific species of Mollusca in the Mediterranean and notes on a collection from the Suez Canal. *Israel Journal of Zoology.*, 21: 301-374.

Barber B.J & Blake N.J., 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* Say). *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 52:121-134.

Barber B.J., Blake N.J., 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Mar. Biol.*, 87: 13-18.

Barber M.D., Fearon K.C., Tisdale M.J., Millan M.C. D.C.& Ross J.A., 2001. Effect of fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediator in patient with pancreatic cancer cachexia. *J. Nutr. Cancer.*, 40(2): 118-124.

Barcelo-Coblijn G., Hogyes E., Kitajka K., Puska L.G., Zvara A., Hackler L. Jr., Nyakas C., Penke Z., Farkas T., 2003. Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100: 11321-11326.

Barille A.L., 1996. Contribution à l'étude des potentialités conchyliques du *Perthuis Breton*. Th.Doc.Univ. Aix-Marseille II: 234 p.

Barnerjee I., Saha S. & Dutta J., 1992. Comparison of the effect of dietary fish oils with different n-3 polyunsaturated fatty acid compositions on plasma and liver lipids in rats. *Lipids.*, 27 (6): 425-8.

Barnathan G., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie*, 91: 671–678.

Bayne B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Wiley M (ed) *Estuarine Processes*. Academic Press, New York., p 432-448.

Baquet C. & Bordenave L., 2002. Les biomatériaux: des matériaux doublement exigeants.

Beaumont A. & Cassier P., 1998. Biologie animale. Des Protozoaires aux Métazoaires épithélioneuriens, tome 1 & 2. DUNOD.

Beaumont André & Cassier Pierre ; 2004. Biologie animale, des Protozoaires aux Métazoaires Epithélioneuriens, Tomes 1 et 2, Ed. Dunod Université, 3e édition.

Bédouet L., Schuller M.J., Marin F., Milet C., Lopez E. & Giraud M., 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comp. Biochem. Physiol B.*, 128: 389-400.

Bella S. Galil., 2007. Seeing Red: Alien species along the Mediterranean coast of Israel *Aquatic Invasions.*, Volume 2, Issue 4: 281-312.

Bellaaj-Zouari A., Dkhili S., Gharsalli R., Derbali A. & Aloui-Bejaoui N., 2011. Shell morphology and relative growth variability of the invasive pearl oyster *Pinctada radiata* in coastal Tunisia. *Marine Biological Association of the United Kingdom.*, page 1 of 11. doi:10.1017/S0025315411001925.

Ben Ammar Rym, Mohamed Ali Ben Smida, Rousseau Marthe, Pierre Gillet & El Cafsi M'hamed ; 2012. Etude de la composition en acides gras des phospholipides de la Poudre de nacre et de la chair de *pinctada radiata* des côtes Tunisiennes. *Bulletin de l'Institut National des Sciences de la Mer (INSTM Salammbô), Tunisie ; 16 :84-89.*

- Ben Ammar Rym, Mohamed Ali Ben Smida, Marthe Rousseau, Pierre Gillet & M'hamed El Cafsi; 2014.** Lipid Characterization of Wild Species *Pinctada radiata* in Southern Tunisia East. *Intern J of engineering Sciences & Research Technology.*, 3(4): 4060-4072.
- Ben Ammar Rym; 2014.** Study of the lipid composition of the flesh and the mother of pearl (nacre) of the pearl oyster *Pinctada radiata* (Leach, 1814) of Tunisian coast. *Inter J of A Sci and Tech Rese.*, Issue 4 vol 3:464-482.
- Beninger P.A. & Lucas A., 1984.** Seasonal variation in condition reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philipinarum* (Adams & Reeve). *Journ.Exp. Mar.Biol. Ecol.*, 79:19-37.
- Ben Youssef S., Selmi S., Ezzeddine-Najai S. & Sadok S., 2008.** Total lipids and fatty acids composition of the coastal and the deep-sea common octopus (*Octopus vulgaris*) populations: a comparative study. *J. Nutr. Health.*, 19 (3):195-201.
- Besnard W., 1948.** Les produits d'origines marine et fluviale. Etude des matières premières : origines applications alimentaires et industrielles leur importance dans l'économie mondiale. Edit. Payot, Paris, 366p.
- Ben-Nissan B. & Le Geros R., 2008.** Biologic and synthetic apatites. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering.*, 1: 225-235.
- Beney L. & Gervais P., 2001.** Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Bioethanol.*, 57: 34-42.
- Beninger P.G. & Lucas A., 1984.** Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, 79: 19-37.
- Berkovic D., Berkovic K., Fleer E. A. M., Eibl H. & Unger C., 1994.** Inhibition of calciumdependent protein kinase C by hexadecylphosphocholine and 1-O-Octadecyl-2-O-

methyl-racglycero- 3-phosphocholine do not correlate with inhibition of proliferation of HL60 and K562 cell lines. *Eur. J. Cancer.*, 30A (4): 509-15.

Berkovic D., Grunvald U., Menzel W., Unger C., Hiddeman W. & Fleer E.A. M., 1995. Effects of hexadecylphosphocholine on membrane phospholipid metabolism in human tumour cells. *Eur. J. Cancer.*, 31A (12): 2080-5.

Berland S., Delattre O., Borzeir S., Catonne Y., Lopez E., 2005. Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. *Biomaterials.*, 26: 2767-73.

Bert M., 1987. Les implants distaux au maxillaire superieur. *Actualites Odonto-Stomat.*, 159 : 579-597.

Bersohn J., Spitz F.J., 1974. Linoleic and linolenic acid dependency of some brain membrane-bound enzymes after lipid deprivation in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, 57: 293-298.

Bialek P., Kern B., Yang X., Schrock M., Sosic D., Hong N., Wu H., Yu K., Ornitz D.M., Olson E.N., Justice M.J., Karsenty G., 2004. A twistcode determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell*, 6: 423-435.

Binukumar B., Mathew A., 2005. Dietary fat and risk of breast cancer. *World J. Surg .Oncol.*, 3: 45-52.

Blond J.P., 1993 - Acides gras essentiels et propriétés de la peau. *J. Revue française des corps gras.*, 3/4 :185-190.

Boggs K., Rock C.O. & Jackowski S., 1998. The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1389: 1-12.

Bombace G., 1967. Sul rinvenimento di alcuni esemplari di *Pinctada radiata* (Leach) nelle acque del canale di Sicilia (Mollusca, Bivalvia). *Natura.*, 58 (4): 298-304.

Bonnick S.L., 2006. Osteoporosis in men and women. *Clin Cornerstone.*, 8(1):28- 39.

Bornstein P., Sage E.H., 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.*, 14:608-16.

Boskey A.L., 1989. "Non-collagenous matrix proteins and their role in mineralization", *Bone Miner.*, 6:111-123.

Boskey A.L., Gadaleta S., Gundberg C., Doty S.B., Ducy P., Karsenty G., 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.*, 23:187-96.

Boukhechba F., Balaguer T., Michiels J.F., Ackermann K., Quincey D., Bouler J. M., Pyerin W., Carle G.F. & Rochet N., 2009. Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *J Bone Miner Res.*, 24:1927-35.

Bourre J.M., François M., Youyou A., Dumont O., Piciotti M., Pascal G., Durand G., 1989. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr*, 119: 1880-1892.

Bourre J.M., 2004. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J. Nutr. Health. Aging*, 8(3): 163-74.

Bowen C.E. & Tang H., 1996. "Conchiolin-protein in aragonite shells of mollusks", *Comp. Biochem. Physiol*, 115A, (1996), 269-275.

Bowers K. T., Keller J. C., Randolph B.A., Wick D.G. & Michaels C.M., 1992. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 7: 302-10.

Bu-Olayan A. H. & Subrahmanyam M. N .V., 1997. "Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and pearl oyster, *Pinctada radiata* from the Kuwait coast before and after the Gulf war oil spill." *Science of the Total Environment.*, 197 (1): 161-165.

Branemark P., 1985. Introduction to Osseointegration. Tissue-integrated protheses. Osseointegration in clinical dentistry. Chicago : Quintessence., 1985.

Brion A., Flausse A., Reboul P ., Bianchi A., Gillet P., Rousseau M.,2012. Osteoproperties of extracts from nacre powder on human osteoblasts. *Bone.*, V 50, (1), P S69.

Brion Alice, Ganggang Zhang, Marie-Hélène Piet, Vanessa Moby, Arnaud Bianchi, Manuel Dossot, Didier Mainard, Laurent Galois, Pierre Gillet & Marthe Rousseau, 2014. Pro-osteogenic properties of nacre extract on two cell lines, primary human osteoblasts and MC3T3-E1 cell line. *Bone Abstracts.*, DOI:10.1530/boneabs.3.PP144.

Bouchon-Brandely G. & Berthoule A., 1891. Les pêches maritimes en Algérie et en Tunisie. Paris :95-97.

Brett P .M., Harle J., Salih V., Mihoc R., Olsen I., Jones F.H. & Tonetti M., 2004. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone.*, 35:124-33.

Brown J.R., Hartwick E.B., 1998. Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I.Absolute and allometric growth. *Aquaculture.*, 70: 231-251.

Brunski J.b., 1992. Biomechanical factors affecting the bone-metal interface: *Review paper* . *Clin Mater.*, 10: 153-201.

Buckwalter J.A et al., 1996. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.*, 45: p. 371-86.

Buckwalter J.A et al., 1996. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.*, 45: p. 387-99.

Buestel D.S., Pouvreau J., Tiapari S., Bougrier J.M., Chabirand P., Geairon A. & Fougereuse ., 2001 :Écophysiologie de l'huître perlière approche des relations entre la croissance de l'huître *Pinctada margaritifera* et le milieu dans le lagon de Takapoto Rapport final convention de recherche N° 7 du Programme Général de Recherche sur la Nacre Ifremer – Evaam.

C

Cabaner C., Gajate C., Macho A., Muñoz E., Modolell M. & Mollinedo F., 1999. Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET- 18-OCH₃: involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br. J. Pharmacol.*, 127: 813-25.

Caers M., Coutteau P., Cure K., Morales V., Gajardo G., Sorgeloos P., 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819).I. Fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 123B : 89-96.

Calder P.C. & Grimble R .F., 2002. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *European Journal of Clinical Nutrition.*, 56:14-19.

Calder P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases *Am J Clin Nutr.*, 83: 1505S-1519S.

Calder P., 2008. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52: 885 – 897.

Calder P.C., Yaqoob P., 2009. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.*, 121:148-157.

Calmar E. A. & Vinci R.J., 2002. The anatomy and physiology of bone fracture and healing. *Clinical Pediatric Emergency Medicine.*, 3(2): 85-93.

Camprasse S., Camprasse G., Pouzol M. & Lopez E., 1990. Artificial dental root made of natural calcium carbonate (bioceram). *Clinical Materials.*, Volume5, Issues 2-4: 235-250 pp.

Chambers T.J. & Fuller K., 1985. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci.*, 76:155-65.

Canalis E., Giustina A. & Bilezikian J.P., 2007. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med.*, 357(9): p. 905-16.

Cancedda R., Giannoni P., Mastrogiacomo M., 2007. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials.*, 28: 4240-50.

Cansell M., Nacka F. & Combe N., 2003. Marine lipid-based liposomes increases *in vivo* FA bioavailability. *Lipids.*, 38: 551-559.

Carano R. A. & Filvaroff E. H., 2003. "Angiogenesis and bone repair." *Drug Discov Today.*, 8(21): 980-9.

Challa Td., Rais Y., Monsonego Ornan E., 2010. Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways. *Molecular And Cellular Endocrinology.*, vol. 323, p. 282-291

Chang Y.L., Stanford C.M. & Keller J.C., 2000. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res.*, 52:270-8.

Chanussot F., 2008. Lécithine, métabolisme et nutrition. Tec & Doc. Paris: pp 1-184.

Chapelle S., 1987. Plasmalogens and *O*-alkylglycerophospholipids in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 88: 507-510.

Charles N. & Cornell M.D., 1999. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts, *Orthopedic Clinic North America.*, (4), 591.

Chateignera D., Hedegaardb C., Wenk H .R., 2000. Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology.*, 22: 1723-1735.

- Choi I.H., Chung C.Y., Cho T.J., Yoo W.J., 2002.** Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci.*, 17:435-47.
- Checa A., 2000.** A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell.*, 32: 405-416.
- Checa A.G., Rodriguez-Navarro A.B., 2005.** Self-organisation of nacre in the shells of Pterioidea (Bivalvia: Mollusca). *Biomaterials.*, 26: 1071–1079.
- Chellaiah M.A., Kizer N., Biswas R., Alvarez U., Strauss-Schoenberger J., Rifas L., Rittling S.R., Denhardt D.T., Hruska K.A., 2003.** Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell.*, 14:173-89.
- Cengiz E.I., Ünlü E., Bashan M., Satar A., Uysal E., 2012.** Effects of Seasonal Variations on the Fatty Acid Composition of Total Lipid, Phospholipid and Triacylglycerol in the Dorsal Muscle of Mesopotamian , Catfish (*Silurus triostegus* Heckel, 1843) in Tigris River (Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*, 12: 33-39.
- Chung C.H., Golub E.E., Forbes E., Tokuoka T. & Shapiro I.M., 1992.** Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.*, 51:305-11.
- Chung U.I. et al., 2004.** Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci.*, 9(4): p. 410-4.
- Colgan D.J., Ponder W.F., 2002.** Genetic discrimination of morphologically-similar, sympatric species of pearl oyster (Mollusca: Bivalvia: *Pinctada*) in Eastern Australia. *J. Mar. Freshw. Res.*, 53: 697-709.
- Colombo D., Ronchetti F., Scala A. & Toma L., 1998.** Bioactive glycoacylglycerolipid analogues: an expeditious enzymatic approach to mono- and diesters of 2-O-b-D-galactosylglycerol. *Tetrahedron-Asymmetr.*, 9: 2113-9.

Colombo D., Compostella F., Ronchetti F., Scala A., Toma L., Tokuda H. & Nishino H., 1999. Chemoenzymatic synthesis and antitumor promoting activity of 6'- and 3- esters of 2-O-beta-Dglucosylglycerol. *Bioorg Med Chem.*, 7 (9): 1867-71.

Comely C.A., 1974. Seasonal variations in the flesh weights and biochemical content of the scallop *Pecten maximus* L.in the cycle Sea area. *Jour.Cons Perm. Int Explor. Mer.*, 35:281-295.

Contractor T., Babiarz B., Kowalski A.J., Rittling S.R., Sorensen E.S., Denhardt D.T., 2005. Osteoclasts resorb protein-free mineral (Osteologic discs) efficiently in the absence of osteopontin. *In vivo* 19:335-41.

Cook H.W., 1991. Fatty Acid Desaturation and Chain Elongation in Eucaryotes, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes* (Vance, D.E., and Vance, J.E., eds.), pp. 181–212, Elsevier Science, Amsterdam.

Cooper G.M., 2000. The Cell: A Molecular Approach 2d ed. *Amer. Soc. Microbiol.*, Washington and *Sinauer Assoc.*, Sunderland, MA. pp.713.

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M. & Ianaro A., 1999. Glycolipids from sponges. VII. Simplexides, novel immunosuppressive glycolipids from the caribbean sponge *Plakortis simplex*. *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters.*, 9: 271-6.

Combe Nicole, Corinne Mignerot, Claude Ridoux, Sylviane Guedj, Christine Poisson; 2002. Recherche de marqueurs lipidiques aptes à montrer l'absence de tissus nerveux dans les matières premières des gélatines d'os, V 9, N 5, 369-74.

Cornwall M.W., 1984. Biomechanics of noncontractile tissues. *Phys Ther.*, 64: 1869-1873.

Corwin R .L., 2003. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.*, 68: 379-386.

Couchourel D., Aubry I., Delalandre A., Lavigne M., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Lajeunesse D., 2009. Altered Mineralization of Human Osteoarthritic Osteoblasts Is Attributable to Abnormal Type I Collagen Production. *Arthritis & Rheumatism.*, vol. 60, n°5,

p. 1438-1450.

Csomor P, Liktor B, Liktor B, Sziklai I, Karosi T; 2001. No evidence for disturbed COL1A1 and A2 expression in otosclerosis. *European Academy Otorhinolaryngol.*, vol. 269.

Cullis P. R., de Kruijff, Hope M., Verkleij A., Nayar R., Farren S., TiJcock C., Madden T. D. & Sally M., 1963. Structural Properties of Lipids and Their Functional Roles in Biological Membrane. *Membrane Fluidity in Biology* ., vol1 ISBN 0-12-053001-5: 39-81.

Currey J.D., 1997. Mechanical properties of mother of pearl in tension. *Proc. Soc. London.B* 196,443-463 pp.

D

Dalla Via G.J., Tappeiner U. & Bitterlich G., 1987. Shore level related morphological and physiological variations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Mollusca, Bivalvia) in the north Adriatic Sea. *Monitore Zool. Ital.*, 21:293-305.

DAHL L.K., 1952. A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.*, vol.80, p 474-479.

Dalsgaard J., John M.S., Kattner G., Muller-Navarra D., Hagen W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46: 225–340.

Dare P.J. & Edwards D.B., 1975. Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of Mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy estuary, North Wales. *Jour. Exp.Mar. Biol. Ecol.*, 18:89-97.

Darriba S., San Juan F., Guerra A., 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis areuatus* (Jefterys 1865). *ICES J. Mar. Sci.*, 62: 886 896.

Datta N. & Holtorf H.L., 2005. "Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells." *Biomaterials.*, 26(9): 971-7.

Davies Je., 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *J. Dental Educ.*, 67: 932-949.

Daum G., 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 822:1-42.

De Koning A.J., 1966. Phospholipids of marine origin. IV. The abalone (*Haliotis midae*). *J. Sci. Food Agr.*, 17, 460.

Delattre O., 2000. La nacre de *Pinctada maxima*, Biomatériau de substitution et de réparation dans les pertes de substances osseuses et cartilagineuses chez le mouton. Applications potentielles en chirurgie orthopédique.

Delaporte M., Soudant P., Moal J., Kraffe E., Marty Y. & Samain J.F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Bioch. Physiol A.*, 140: 460–470.

Delaunay F., Marty J., Moal J. & Samain J.F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L). larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 173:163–179.

DeLise A.M., Fischer L. & Tuan R.S., 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8:309-334.

Dembitsky V.M., 1979. Plasmalogens in phospholipids of marine invertebrates. *Biol. Morya* 5: 86-90.

De Moreno J.E.A., Moreno V.J. & Brenner R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids.*, 11: 561- 566.

De Moreno R. J., 1980. Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus Platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 48:263-276.

Denhardt D. T., C. A. Lopez et al., 1995. "Osteopontin-induced modifications of cellular functions." *Ann N Y Acad Sci.*, 760: 127-42.

Derbali A., Jarboui O. & Ghorbel M., 2011. Distribution, abundance and population structure of *Pinctada radiata* (Mollusca: Bivalvia) in southern Tunisian waters (central Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine.*, 52: 23–31.

Demers C., Hamdy C.R., Corsi K., Chellat F., Tabrizian M. & Yahia L., 2002. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng.*, 12:15-35.

De Vries D.J. & Hall M.R., 1994. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Development Research.*, 33: 161-173.

Di Maggio N., Piccinini E., Jaworski M., Trumpp A., Wendt D.J. & Martin I., 2011. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials.*, 32:321-9.

Dimitriou R., Tsiridis E. & Giannoudis P.V., 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.*, 36:1392-404.

Di Natale A., 1982. Extra-Mediterranean species of Mollusca along the southern Italian coast. *Malacologia.*, 22: 571-580.

Di Monterosato T.A., 1899. Coquille marines de Chypre. *Jour. Chonchyl.*, 57(3). 4ème sér, tome 1er:392-397.

Discher D.E., Mooney D. J. & Zandstra P.W., 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.*, 324: 1673-7.

Dreier Rita; 2010. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Research & Therapy.*, 12:216.

Dridi S., Romdhane M.S. & El Cafsi M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture.*, 263:238-248.

Dridi S., Romdhan M.S. & M'hamed El Cafsi; 2008. Croissance et variations saisonnières de la composition en acides gras de l'huître *Crassostrea gigas* cultivée dans la lagune de Bizerte, Tunisie. *Belg. J. Zool.*, 138, 158-169.

Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G., 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.*, 382:448-52.

Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G., 1997. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.*, 89: 747-754.

Duplat D., Chabadel A., Gallet M., Berland S., Bedouet L., Rousseau M., Kamel S., Mileta C., Jurdic P., Brazier M., Lopez E., 2007. The in vitro osteoclastic degradation of nacre. *Biomaterials.*, 28: 2155–2162.

Duronio R. J., Reed S I., Gordon J.I., 1992. Mutations of human myristoyl CoA : protein N-myristoyltransferase cause temperature- sensitive myristic acid auxotrophy. *Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:4129- 4133.

Duvall C.L., Taylor W.R., Weiss D., Wojtowicz A.M., Guldberg R.E., 2007. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 22:286-97.

E

Eames B.F., de la Fuente L & Helms J.A.,2003. Molecular ontogeny of the skeleton. Birth Defects. *Res C Embryo Today*, 69: 93-101.

Eid K., Zelicof S., Perona B. P., Sledge C.B. & Glowacki J., 2001. Tissue reaction to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation, *J. of Orthopaedic Research.*, (19), 962.

Einhorn T.A., 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*: S7-21.

El-Ghannam A., 2005. "Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering." *Expert Rev Med Devices.*, 2(1): 87-101.

Engler A., Bacakova L., Newman C., Hategan A., Griffin M. & Discher D., 2004. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J.*, 86: 617-28.

Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Nomura S., Himeno M., Kitamura Y., Kishimoto T. & Komori T., 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.*, 275: 8695-8702.

Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Nomura S., Himeno M., Kitamura Y., Kishimoto T., Komori T., 2002. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.*, 275: 8695-8702.

Epp J., Bricelj V.M. & Malouf R.E., 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 121: 113-136.

Eriksson Ar. & Albrektsson T., 1983. Temperature treshold levels for heat-induced bone tissue injury ; a vital-microscopic study in the rabbit. *J. Prosth. Dent.*, 50: 101-107.

Ezzeddine-Najai S., 1997. Sexual maturity of *Eledone moschata* (Cephalopoda, Octopoda) from the gulf of Gabes (Tunisia, Eastern Mediterranean). *J. Vie Milieu.*, 47: 69-76.

F

Fain maurel M.A., 1994. Biologie de la cellule. 303.

Fiches FAO/WHO, Fats and oils in human nutrition (Report of a joint expert consultation), Fat and Nutrition paper 57, Rome : FAO, 1994.

Farre B. & Dauphin Y., 2009. Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha Mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.*, 152:103-109.

Feng Q.L., Cui F.Z., Pu G., Wang R.Z. & Li H.D., 2000. Crystal orientation, toughening mechanisms and a mimic of nacre. *Materials Science and Engineering C.*, 11: 19–25.

Feng Q.L., Pu G., Pei Y., Cui F. Z., Li H.D. & Kim T. N., 2000. "Polymorph and morphology of calcium carbonate crystals induced by proteins extracted from mollusk shell." *J. of Cristal Growth.*, 216:459-465.

Fernandes H., Mentink A., Bank R., Stoop R., van Blitterswijk C. & de Boer J., 2010. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A.*, 16:1693-702.

Fisher P., 1865. Notes sur les faunes conchyliologiques des deux rivages de l'isthme de Suez. *Jour. Chonchyl.*, Tome V, n° 2 :242-247.

Fischer P.H., 1950. Vie et moeurs des Mollusques. Edit. Payot, Paris, 312p.

Ficher W., Schneider M. & Bauchot M.I., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37. Révision 1. Vol.I. Végétaux et invertébrés :760 p.

Fischer D .J., Liliom K., Guo Z., Nusser N., Virag T., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Erickson J .R., Sun G., Miller D .D. & Tigyi G., 1998. Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit differents cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Molecular Pharmacology.*, 54 (6): 979-88.

Fischer S. & Odendaal T.F., 2012. Evolution of the bone gene regulatory network. *Genetics & Development.*, vol. 22, p. 1-8.

Fiz da Costa, Susana No'voa, Justa Ojea & Dorotea Martinez-Patino; 2011. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Mar Biol.*, 158:1829–1840.

Flandroy L., 1995. Des molécules venues de la mer. *Biofutur*, **Octobre** : 24-8.

Freites L., Fernandez-Reiriz M .J ., Labarta U., 2002. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comp. Biochem. Physiol B*, 132: 453–461.

Franceschi R.T.,1992. "The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation", *Nutr. Rev.* 50: 65-70.

Franceschi R.T., Iyer B.S., 1992. "Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells", *J. Bone Miner. Res.*, 7: 235-246.

Franceschi R.T., Iyer B.S., Cui Y., 1994. "Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells", *J. Bone Miner. Res.* 9: 843-854.

Fulzele Keertik , Ryan C Riddle , Xuemei Cao , Chao Wan , Dongquan Chen , Marie-Claude Faugère , Susan Aja , Mehboob A. Hussain , Jens C. Brüning & Thomas L. Clemens ; 2007. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell.*, 142(2): p. 309-19.

Funck-Brentano T., Cohen-Solal M., 2010. Bone aging: new actors of bone cell communication. *Mmédecine & Longévité.*, 2:200–4.

G

Gabbott P.A., 1976. Energy metabolism. In: Marine mussels, their ecology and physiology. Ed. By B. L. Bayne. Cambridge: Cambridge University Press P: 294-355.

Gabbott P. A., Bayne B .L., 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc.*, U.K, 53: 269-286.

Gabbott P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalves molluscs. A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proc. Eur. Mar. Biol. Sym.*, 9th Oban, Scotland: 191-211.

Gabbott P. A., 1983. Developpemental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. and Wilbur, K. M . (eds), the Mollusca. Vol.2, Environ. Biochem. Physiol. Academic Press New York: 165-217.

Gajate C., Fonteriz R.I., Cabanier C., Alvarez-Noves G., Alvarez-Rodriguez Y., Modolell M. & Mollinedo F., 2000. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J. Cancer.*, 85: 674-82.

Gervis M.H. & Sims N.A., 1992. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). ICLARM Stud. Rev: Manila, Philippines. 49p. Gerwick, W.H., 1993. Carbocyclic oxylipins of marine origin. *Chemical Reviews.*, 93, 1807-1823.

Giese A.C., 1969. A new approach to the biochemical composition of the mollusc body. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*,7: 175-229.

Gil A., 2002. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedecine & Pharmacotherapy.*, 56(8): 388-96.

Gilles B., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie.*, 91 :671–678.

Gille Doreen ; 2011. Acides gras saturés & lactoferrine: des bâtisseurs de charpente osseuse? *Maillaiter SMP.* (juillet/août), 2011, 1-2.

Glimcher M.J., 1987. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect.*, 36: p. 49-69.

Glencross B. D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture.*, 1: 71-124.

Goldgerg M., 1989. Manuel d'histologie et de biologie buccale, p116.

Goldring M.B., Tsuchimochi K., Ijiri K., 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 97: 33-44.

Goldwasser F., Le Péchoux C. & Anract P., 2007. Prise en charge médicale et chirurgicale des métastases osseuses. *In: Cancers osseux. Ed P Anract. JL Libbey eurotext.*, pp. 37-74.

Gould; 1850. Schells from the United States exploring expedition. *Proc. Boston. Soc. Nat. Hist.* Tome 3: 309-312.

Grand Larousse Universel p.5047.

Graeve M., Kattner G., Hagen W., 1994. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 182: 97–110.

Graeve M., Lundberg M., Boer M., Kattner G., Hop H. & Falk-Petersen S., 2008. The fate of dietary lipids in the Arctic ctenophore *Mertensia ovum* (Fabricius 1780). *Mar. Biol.*, 153: 643–651.

GRANT W.T., WANG G.J., BALIAN G., 1987. Type X Collagen Synthesis during Endochondral Ossification in Fracture Repair. *The Journal Of Biological Chemistry.*, vol. 262, n°20, p. 9844-9849

Gruvel A. & Moazzo G., 1931. Contribution à la faune malacologique marine des côtes Libano-Syriennes. Pp. 437-456. *In: A. Gruvel (ed.), Les états de Syrie. Richesses marines et fluviales.* Société des Editions Géographiques, Maritimes et Coloniales, Paris.

Guenther J., Southgate P.C., de Nys R., 2006. The effect of age and shell size on accumulation of fouling organisms on the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). *Aquaculture.*, 253 : 366– 373.

Guesnet P., Alessandri J.M., Vancassel S., Denis I., Laviolle M ; 2005. Omega 3 fatty acids and functions of the central nervous system. *Nutrition Clinique et Métabolisme.*, 19: 131-134.

Guesnet P., Alessandri J.M., Astorg P., Pifferi F., Lavialle M., 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL.*, 12 : 333-343.

Gutierrez S., Javed A., Tennant D.K., van Rees M., Montecino M., Stein G.S., Stein J.L., Lian J.B., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem*, 277: 1316-1323.

H

Hall J.M., Parrish C.C., Thompson R.J., 2002. Eicosapentaenoic acid regulates Scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *The Biological Bulletin*, 202: 201-203.

Hamza S., Hassen W., Takrouni M., Azari Z., Zouari M., Boussaid M., 2007.

Etude des caractéristiques mécaniques et physico-chimiques du Corail et de la Nacre exploités en tant que substitut osseux. 8èmes Congrès de Mécanique (17-20 avril 2007) F. S. El Jadida, Maroc.

Hamza Samir & Mounir Zouari; 2008. Comportement En Service Des Biomatériauxutilisés En Orthopédie. Jet Du 07 Au 09 Mai 2008.

Hamza Samir, Meryem Bouchemi, Nouredine Slimane, Zitouni Azari; 2013. Physical and chemical characterization of adsorbed protein onto gold electrode functionalized with Tunisian coral and nacre. *Materials Science and Engineering C.*, 33:537–542.

Ham A. W., 1952. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg Am.*, 24-A3:701-28.

Hanada K., Kumagai K., Yasuda S., Miura Y., Kawano M., Fukasawa M., & Nishijima M., 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature.*, 426, 803-809.

Hanashima S., Mizushina Y., Yamazaki T., Ohta K., Takahashi S., Koshino H., Sahara H., Sakaguchi K. & Sugawara F., 2000. Structural determination of sulfoquinovosyldiacylglycerol by chiral syntheses. *Tetrahedron., Lett*, 41: 4403-7.

Hanuš L.O., Levitsky D.O., Shkrob I., Dembitsky V.M., 2009. Plasmalogens, fatty acids and alkyl glyceryl ethers of marine and freshwater clams and mussels. *Food Chem.*, 116:491-498.

Hansson L.E., nyren O., Bergstron R., 1993. Diet and risk of gastric cancer. A population-based case control study in Sweden. *In. J. Cancer.*, 55:181-189.

Harris W.S., Von Schacky C., 2004. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Preventive Medicine.*, 39 (1): 212-220.

Hasegawa T., Takeuchi A., Miyaishi O., Xiao H., Mao J., Isobe K., 2000. PTRF (polymerase I and transcript-release factor) is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 (binding factor of a type-I collagen promoter) zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type-I collagen gene promoters. *Biochemical Engineering Journal.*, vol. 347, p. 55-59.

Hattori T., Adachi K. & Shizuri Y., 1998. New ceramide from marine sponge *Halicona koremella* and related compounds as antifouling substances against macroalgae. *J. Nat. Prod.*, 61 : 823-6.

Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B., Sandsdalen E., Olsen O.M., Stensvag K., 2002b. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology.*, 81, 94-102.

Hawkins A.J.S. & Bayne B.L., 1991. Nutrition of marine mussels factors influencing the relative utilizations of protein and energy. *Aquaculture.*, 94:177-196.

Haygood M.G., Schmidt E.W., Davidson S.K. & Faulkner D.J., 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: Opportunities for microbial biotechnology. *J. Molec. Microbiol. Boitechnol.*, 1 (1) : 33-43.

Hazel J.R., Williams E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.*, 29: 167–227.

Hellio C., Bremer G., Pons A.M., Le Gal Y. & Bourgougnon N., 2000. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 54 (4): 543-9.

Héral M., Razet D., Maestrini S. & Garnier J., 1980. Composition de la matière organique particulate dans les eaux du Bassin de Marennes-Oléron. Apport énergétique pour la nutrition de l'huître. *C.I.E.M. C. N.*, L : 44, 14 p.

Hichami A., Datiche F., Ullah S., Liénard F., Chardigny J.M., Cattarelli M., Akhtar Khan N., 2007. Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered in n – 3 fatty acid-depleted rats. *Behavioural Brain Research*, 184: 1-10.

Hildebrandt C., Buth H. & Thielecke H., 2009. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 191:23-32.

Hochachka P.W. & Somero G. N., 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution; Oxford University Press: Oxford, NY, USA.

Hochachka P.W., Mommsen T.P. (Eds.), 1995. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, *Environmental and Ecological Biochemistry.*, vol. 5. Elsevier Press, Amsterdam.

Holmström C. & Kjelleberg S., 1999. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 30: 285-93.

Hong C., West C. R., Bernacki R. J., Tebbi C .K. & Berdel W.E., 1991. 1-b-Darabinofuranosylcytosine conjugates of ether and thioether phospholipids. A new class of Ara-C prodrug with improved antitumor activity. *Lipids.*, 26 (12): 1437-44.

Hong S., Gronert K., Devchand P. R., Moussignac R.-L. & Serhan C.N., 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 14677-14687.

Horrocks L.A & Yeo Y.K., 1999. Health benefits docosahexanoic. *J.Pharmacol Res.*, 40 (3): 211-225.

Harada S., & Rodan G.A., 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-355.

Hasegawa T., Takeuchi A., Miyaishi O., Xiao H., Mao J., Isobe K., 2000. PTRF (polymerase I and transcript-release factor) is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 (binding factor of a type-I collagen promoter) zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type-I collagen gene promoters. *Biochemical Engineering Journal.*, vol. 347, p. 55-59.

Hatano K., Inoue H., Kojo T., Matsunaga T., Tsujisawa T., Uchiyama C. & Uchida Y., 1999. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone.*, 25:439-45.

Hatch G. M., Choy P.C., 2004. Phospholipid biosynthesis. In: Van der Vusse, G. (Ed.), *Advances in molecular and cell biology, Lipobiology.*, pp. 357-385.

Hayes D.W., Brower R. & John K.J., 2001: Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg.*, 18: 35-53.

Heinemann F., Treccani L. & Fritz M., 2006. Abalone nacre insoluble matrix induces growth of flat and oriented aragonite crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 344: 45–49.

Herdman W.A & Hornell J., 1903. Observations and experiments on the life-history and habitats of the Pearl Oyster. *Rep. Pearl Fish. Manaar.*,1:46-130.

Hill P.A., 1998. "Bone remodelling", *Br J Orthod.*, 25: 101-107.

Hmso U.K., 1994. (Her Majesty's Stationery Office). Nutritional aspects of cardiovascular disease report on health and social subjects. No. 46, HMSO, London.

Hojo H., Ohba S., Yano F., Chung U.I., 2010. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J. Bone Miner. Metab.*, 5 : 489-02.

Hollinger J. & M.E Wong., 1996. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 82(6): p. 594-606.

Horwitz E.M et al., 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.*, 5(3): 309-13.

Howard D., BATTERY L.D., Shakesheff K.M., Roberts S.J., 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat.*, 213:66-72.

Hynd J.S., 1955. A revision of Australian pearl shells, genus *Pinctada*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 6: 98–137.

Hu F.B. & Willett W.C., 2002. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *The Journal of the American Medical Association.*, 288 (20): 2569-2578.

Huey R.B. & Kingsolver J.G., 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance *Trends in Ecology and Evolution.*, 4: 131 – 135.

Hughes T.A., Heimberg M., Wang X., Wilcox H., Hughes S.M., Tolley E.A., Desiderio D.M. & Dalton J.T., 1996. Comparative lipoprotein metabolism of myristate, palmitate and stearate in normolipidemic men. *Metabolism.*, 45: 1108-1118.

Hunter G.K., Hauschka P.V., Poole A.R., Rosenberg L.C., Goldberg H.A., 1996. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.*, 317 (Pt 1):59-64.

I

Imbs A.B., Latyshev N.A., Zhukova N.V., Dautova T.N., 2007b. Comparison of fatty acid compositions of azooxanthellate *Dendronephthya* and zooxanthellate soft coral species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 148B: 314–321.

Irathni I., 2006. Etude de l'écobiologie du Mollusque bivalve *Pinctada radiata* (Leach, 1814) sur le littoral Nord et Est de la Tunisie. Thèse, 255p. Univ. Tunis.

Irazu C.E., Pollero R.J., Brenner R.R., 1984. Occurrence of a 22:2 Nonmethylene Interrupted Dienoic Fatty Acid and Its seasonal distribution among lipids and tissues of the Fresh Water Bivalve *Diplodon delodontus* From an Isolated Environment. *Lipids*, 19:649-655.

Ishihara K., Murata M., Kaneniwa M., Saito H., Shinohara K. & Yamamoto M., 1998. Inhibition of icosanoid production in MC/9 mouse mast cells by n-3 polyunsaturated fatty acids isolated from edible marine algae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 1412-5.

J

Jaiswal R. K., Jaiswal N., Bruder S .P., Mbalaviele G., Marshak D. R. & Pittenger M.F., 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.*, 275:9645-52.

Jameson H.L., 1901. On the identity of the mother of pearl oysters; with a revision of the subgenus *Margaritifera*. *Proc. Zool. Soc. London.*, Vol. I: 372-394.

Jayabal R. & Kalyani M., 1987. Seasonal variations in biochemical constituents of different body components of *Meretrix meretrix* (L). *Mahasagar Bull. Natl. Inst. Oceanogr.*, 20(1): 65-69.

Je J.Y., Park P. J., Byun H .G., Jung W. K. & Kim S. K., 2005. "Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel", *Mytilus edulis. Bioresource Technology.*, vol. 96, 14:1624-1629.

Ji L., Zhang G., Uematsu S., Akahori Y. & Hirabayashi Y., 1995. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett.*, 358 (2): 211-14.

Jonsson P.R., Berntsson K.M., Andre C., Wangberg S.A., 1999. Larval growth and settlement of European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Marine Biology*, 134: 559–570.

Jingushi S., Joyce M.E., Bolander M.E., 1992. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res.*, 7:1045-55.

Joseph J.D., 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid Res.*, 21:109-153.

Judé S., Roger S., Martel E., Besson P., Richard S., Bougnoux P., Champeroux P. & Le Guennec J.Y., 2006. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 90: 299-325.

Jung W.K. & Kim S.K., 2009. "Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*", *Food Chemistry.*, vol. 117, 4:687-692.

K

Kal'chenko E.I., Videnskaya T.L. & Yur'eva M.I., 2004. Feeding and fatty acid content of wild and captured juveniles of dog-salmon during keeping in river fishponds. In Proceedings of the International Conference Current Problems of Physiology and Biochemistry of Aquatic Organisms, Petrozavodsk, Russia, 6–9 September; Nemova, N.N., Ed.; KarRC RAS: Petrozavodsk, Russia, p. 58.

Kanazawa A., Teshima S., Tokiwa S., Kayama M., Hirata M., 1979. Essential fatty acids in the diet of prawn - II. Effect of docosahexaenoic acid on growth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45 : 1151-1153.

Kaneda T., 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*. I. ISO and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.*, 93: 894-903.

Kania R.E., Meunier A., Petite H., Hamadouche M. & Sedel L., 1997. Accélération de la formation osseuse avec un composite colle biologique-facteurs plaquettaires-corail naturel (Acceleration of bone formation with a mixture made of fibrin sealant-platelet factors-natural coral). *Innov. technol. biol. méd.* ISSN 0243-7228, vol. 18, no3: 233-238.

Karmali R.A., 1989. n-3 fatty acids and cancer. *J. Intern. Med. Suppl.*, 225(731): 197-200.

Karsenty G., 2000. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Seminars in cell & developmental biology.*, 11, 343-346.

Katsanevakis S., 2005. Abundance and spatial distribution of the Mediterranean scallop, *Pecten168 jacobaeus*, in a marine lake, *Fisheries Research.*, 76: 417-429.

Kasugai S., Todescan R., Nagata T., Yao K.L., Butler W.T., Sodek J., 1991. "Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype", *J. Cell. Physiol.*, 147: 111-120.

Kimura Y., 2002. Carp oil or oleic acid, but not linoleic acid or linoleic acid, inhibits tumor growth and metastasis in Lewislung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.*, 132(7): 69-75.

Kinsella J.E., 1988. Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technology.*, 124-45.

Karsdal M.A., Larsen L., Engsig M.T., Lou H., Ferreras M., Lochter A., Delaisse J.M. & Foged N.T., 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.*, 277:44061-7.

Karageorgiou V. & Kaplan D., 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.*, 26: 5474-91.

Kern B., Shen J., Starbuck M., & Karsenty, G., 2001. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *The Journal of biological chemistry*, 276:7101-7107.

Khamdan S.A.A., 2001. Incidence of Polydora, Cliona and Naturel Pearl in the Gulf Pearl Oyster, *Pinctada radiata* (Leach, 1814). Directorate of Environmental Assessment and Planning, Environmental Affairs, Ministry of Housing, *Municipalities and Environment*: 7p.

Khatiwala C.B., Peyton S. R. & Putnam A. J., 2006. Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 290: C1640-50.

Khatiwala C.B., Peyton S. R., Metzke M. & Putnam A.J., 2007. The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *J Cell Physiol.*, 211, 661-72.

Khatiwala C.B., Kim P.D., Peyton S.R. & Putnam A.J., 2009. ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res.*, 24:886-98.

Keller J.C., Schneider G. B., Stanford C.M. & Kellogg B., 2003. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent.*, 12: 175-81.

Keselowsky B.G., Collard D.M. & Garcia A. J., 2004. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials.*, 25: 5947-54.

Kieswetter K., Schwartz Z., Hummert T.W., Cochran D.L., Simpson J., Dean D.D & Boyan B.D., 1996. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res.*, 32:55-63.

Kikuchi M., Matsumoto H.N., Yamada T., Koyama Y., Takakuda K. & Tanaka J., 2004. Glutaraldehyde crosslinked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials.*, Vol. 25, No, 1: 63-69.

Kinzelbach R., 1965. Ein Standföhkrebs, *Orchestia cavimana* Heller, am Oberrhein. *Beitr. Naturk. Forsch. SüdwDTL.*, 24(2): 153-157.

Kitajka K., Puskas L.G., Zvara A., Hackler L. Jr., Barcelo-Coblijn G., Yeo Y.K., Farkas T., 2002. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 : 2619-2624.

Kitajka K., Sinclair A., Weisinger R., Weisinger H., Mathai M., Jayasooriya A., Halver J., Puskas L., 2004. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *PNAS*, 101 : 10931–10936.

Klingensmith J.S., 1982. Distribution of methylene and non methyleneinterrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissue of the hardshell clam (*Mercanaria mercenaria*). *Lipids.*, 17: 976–981.

Koizumi C., Jeong B .Y., Ohshima T., 1990. Fatty chain composition of ether and ester glycerophospholipids in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Lipids.*, 25: 363-370.

Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson RT, Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S. & Kishimoto T., 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89: 755-764.

Komori T., 2010. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.*, 339, 189-195.

Kornprobst J.M., 2005. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Tec & Doc Lavoisier, paris, 1834 pp.

Kostetsky E .Y., Velansky P.V., 2009. Phospholipids of sea worms, mollusks, and arthropods. *Russ. J. Mar. Biol.*, 35: 187-199.

Kothapalli K., Anthony J., Pan B., Hsieh A., Nathanielsz P., Brenna T., 2007. Differential Cerebral Cortex Transcriptomes of Baboon Neonates Consuming Moderate and High Docosahexaenoic Acid Formulas. *PLoS One.*, 2: e370.

Koyama Y., Rittling S. R. et al., 2006. "Osteopontin deficiency suppresses high phosphate load-induced bone loss via specific modulation of osteoclasts." *Endocrinology.*, 147(6): 3040-9.

Kraffe E., 2003. Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves; apport des méthodes chromatographiques. Ph. D. thesis dissertation, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 243.

Kraffe E., Soudant P., Marty Y., 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids.*, 39:59-66.

Kraffe E., Soudant P. & Marty Y., 2006. cis-4, 7, 10, trans-13–22 4 fatty acid distribution in phospholipids of pectinid species *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus*. *Lipids.*, 41: 491-497.

Kronenberg H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.*, 423: 332-6.

Kruyt M.C., De Bruijn J.D., Wilson C.E., Oner F.C., Van Blitterswijk C. A., Verbout A. J. & Dhert W.J., 2003. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Eng.*, 9:327-36.

Ktari-Chakroun F. & Azouz A., 1971. Les fonds chalutables de la région sud-est de la Tunisie (golfe de Gabès). *Bull. Inst. Natn. Scient. Tech. Océanogr. Pêche Salammbô.*, 2 : 155-248.

Kuboki Y., Takita H., Kobayashi D., Tsuruga E., Inoue M., Murata M., Nagai N., Dohi Y. & Ohgushi H., 1998. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with

geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res.*, 39:190-9.

Kujala U.M., Kettunen J., Paananen H., Aalto T., Battié M.C., Impivaara O., Videman T. & Sarna S., 1995. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum.*, 38: 539-546.

Kuratko C. N. & Becker S.A., 1998. Dietary lipids alter fatty acid composition and PGE2 production in colonic lymphocytes. *Nutr. and Cancer.*, 31 (1) : 56-61.

L

Laadhar L., Zitounia M., Kalle-Sellamia M., Mahjouba M., Sellamib S. & Maknia S., 2007. Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: susceptibility factors and inflammatory mechanisms. *La Revue De Medecine Interne.*, vol. 28: 531–536.

Labovitz J.M. & Revill K., 2007. Osteoporosis: pathogenesis, new therapies and surgical implications. *Clin Podiatr Med Surg.*, 24(2):311-32.

Lahmeri Cyrine, 2007. Valorisation de la nacre de *Pinctada radiata* en tant que substitut osseux : essais préliminaires chez le chien. Thèse de doctorat p 236 Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet. (TN).

Lai H.C., Zhuang L. F., Liu X., Wieland M., Zhang Z.Y. & Zhang Z.Y., 2010. The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates. *J Biomed Mater Res A.*, 93, 289-96.

Lamarck (DE) J .B. P.A., 1819. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. Tome VII. 2 ème édit par Edwards et Deshayes : 104-108.

Lane J., 1986. Allometric and biochemical studies on starved and unstarved clams, *Rangia cuneata* (Sowerby, 1831). *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.*, 95: 131-143.

Laneuville O., Breuer D.K. & Xu N., 1995. Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)-octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *The J Biol Chem.*, 270: 19330-19336.

Lamghari M., Huet H., Laurent A., Berland S. & Lopez E., 1999. A model for evaluating injectable bone replacements in the vertebrae of sheep: radiological and histological study. *Biomaterials.*, 20: 2107-2114.

Lamghari M., Berland S., Laurent A., Huet H. & Lopez E., 2001-a. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials.*, 22: 555-562.

Lamghari M., Antonietti P., Berland S., Laurent A., Huet H. & Lopez E., 2001-b. Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. *J. bone Min. Res* 16.

Lamy E., 1929a - Les avicules de la mer rouge. Bull. Mus. Hist. Nat. Paris. Tome I. 2ème sér. Ed. Masson: 111-116.

Lamy E., 1929b – Note sur quelques Lamellibranches de la Martinique. Bull. Mus. Hist. Nat. Paris. Tome I. 2ème sér. Ed. Masson: 201-203.

Lamy E., 1932. Liste des lamellibranches recueillis en Nouvelle Calédonie par RISBEC M. J (1928-1932). Bull. Mus. Hist. Nat. Paris. Tome IV. 2ème sér. Ed. Masson: 980-983.

Langer R. & Vacanti J.P., 1993. Tissue engineering. *Science* 260: 920-6.

Larsson T.F., Martín J.M. & Vallés J.L., 2007. Biomaterials For Healthcare Euro 22817 Directorate - General for Research, Industrial technologies Unit G3 _Value– Added Materials _Europe Direct is a service to help you find answers to your questions about the European Union.

Launoy G., Milan C., Day N.E., Pienkowski M.P., Gignoux M. & Faivre J., 1998. Diet and Squamous cell cancer of oesophagus: a French multicentre case-control study. *Int. J. Cancer.*, 76:1-7.

Lauritzen L, Hansen H.S., Jorgensen M.H., Michaelsen K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 40: 1-94.

Lee N.K., Sowa H., Hinoi E., Ferron M., Ahn J.D., Confavreux C., Dacquin R., Mee P.J., McKee M.D., Jung D.Y., Zhang Z., Kim J.K., Mauvais-Jarvis F., Ducy P. & Karsenty G., 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.*, 130(3):456-69.

Le Faou A., 1996. Processus d'ostéoinduction généré par la nacre : mise en évidence et régulation in vivo. Thèse pour le doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, spécialité : Physiologie, Endocrinologie.

Lefebvre V., Li P., De Crombrughe B., 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J.*, 17: 5718-5733.

Le Grand P., Catheline D., Rioux V. & Durand G., 2002. Lauric acid is desaturated to 12:1 n-3 by hepatocytes and rat liver homogenates. *Lipids.*, 37,569-572.

Le Grand P., 2007. Les acides gras: structures, fonctions, Apports nutritionnels conseillés. *Cah. Nutr. Diét.*, 42, Hors série 1,1S7-1S12.

Lehninger A.L., Nelson D.L., and Cox M.M., 1994. Principes de biochimie. Ed. Médecine, Sciences, Flammarion (Deuxième édition), 1035p.

Leitzmann M.F., Stampfer M. J., Michaud D. S., Augustsson K., Colditz G.C., Willett W C., Giovannucci E.L., 2004. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 204-216.

Le Pennec M., Robert R., Advendano M., 1998. The importance of gonadal development on larval productions in pectinids. *Journal of shellfish research*, 17: 97-101.

Le Pennec G., Le Pennec M., Beninger P.G., 2001. Seasonal digestive gland dynamics of the scallop *Pecten maximus* in the bay of Brest (France). *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 81:663-671.

Lian J.B., Stein G.S., 1995. "Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation", *Iowa Orthop J.*, 15: 118-140.

Lian J.B., Stein G.S., Canalis E., Robey P.G., Boskey A.L., 1999. "Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process", In: *Primer on the metabolic bone diseases of mineral metabolism* (Favus M.J, Ed.), p16-24; Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Lindner G., 2005. Guide des coquillages marins, plus de 1000 espèces des mers du monde, éditions delachaux et niéslé. P 141-151.

Linkow Li., 1968. The blade vent : a new dimension in endosseous implantology. *Dent. Concept.*, 11 : 3-12.

Lincks J., Boyan B.D., Blanchard C.R., Lohmann C.H., Liu Y., Cochran D.L., Dean D.D. & Schwartz Z., 1998. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials.*, 19: 2219-32.

Livak K.J. & Schmitgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, vol 25, p 402-408.

Lodeiros C.J., Rengel J.J., Guderly H.E., Nusetti O. & Himmelman J.H., 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture.*, 199: 63-72.

Lo C.M., Wang H.B., Dembo M. & Wang Y. L., 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.*, 79:144-52.

Löfgren S.E, Miletto L.C., Steindel M., Bachère E. & Barracco M.A., 2008. "Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals", *Experimental Parasitology*, vol. 118, 2:197-202.

Lopez E., Vidal B., Berland S., Camprasse S., Camprasse G. & Silve C., 1992. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*, *Tissue Cell*, 24(5):667-679.

Lopez E., Berland S., & Le Faou A., 1994. La nacre au service du squelette humain. *La Recherche*, 262: 208-210.

Lopez E., Berland S. & Le Fou A., 1995. Nacre osteogenic and osteoinductive properties. *Bull Inst Ocean Monaco*, 143: 49-57.

Lopez E. et al., 1997. Method For Preparation Of Active Substances From Nacre, Resulting Products, Useful In Medicinal Applications WO_1997_024133_A1.

Lopez E., Le Faou A., Borzeix S. & Berland S., 2000. Stimulation of rat coetaneous fibroblasts and their synthetic activity by implants of powdered nacre (mother of pearl). *Tissue and cell*, 32 (1):95-101. (22): 2232-2237.

Lopez E., Rousseau M., Bourrat X., 2008. La nacre, les biominéralisations et leur pharmacopée. *Biofutur*, V. 27, n°291, p. 53-56.

Loty C., Loty S. & Sautier J.M., 1998. Interfaces os/biomatériaux bioactifs implantables, *Implant.*, (4), 101.

Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinerio G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G., 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386:78-81.

M

MacDonald J.I., Sprecher H., 1989. Distribution of arachidonic acid in choline- and

ethanolamine-containing phosphoglycerides in subfractionated human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 264: 17718-17726.

Mackie E.J., Ahmed Y.A., Tatarczuch L., Chen K.S. & Mirams M., 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.*, 40:46–62.

Magne D., Bluteau G., Fauchoux C., Palmer G., Vignes-Colombeix C., Pilet P., Rouillon T., Caverzasio J., Weiss P., Daculsi G., Guicheux J., 2003. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J. Bone Miner. Res.*, 18: 1430-42.

Mahfoud ; 2009. Cancers de l'os ou tumeurs osseuses malignes des membres.

Malaval L., De Vernejoul M-C., Marie P., 2009. Matrice osseuse. Traité des Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M.-S Flammarion. Paris : 30-42.

Mainard D., Guoin F., Chauveaux D. & Loty B., 2001. Les substituts osseux en 2001, Ed. Romillat.

Maier T., Jenni S. & Ban N., 2006. Architecture of Mammalian Fatty Acid Synthase at 4.5 Å Resolution, *Science.*, vol. 311:1258 – 1262.

Maktoob A. & Ronald H.T., 1997. Handbook of Natural Products from Marine Invertebrates. Phylum mollusca Part. 1. *Harwood academic publishers.*, 1-288 pp.

Mann V., Huber C., Kogianni G., Collins F., Noble B., 2007. The antioxidant effect of estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis *in vitro Bone.*, 40: 674-684.

Mann R. & Glomb S.J., 1978. The effect of temperature on growth and ammonium excretion of the manila clam *Tapes japonica*. *Estuarine Coastal Mar. Sci.*, 6: 335-339.

Marin F. & Luquet G., 2004. Molluscan shell proteins. *C. R. Palevol.*, 3: 469-492.

Marin F., Luquet G., Marie B. & Medakovic D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 80: 209-276.

Marieb E., 2005. Anatomie et physiologie humaines. Pearson Education, Paris, p. 258-281.

Marinucci L., Balloni S., Becchetti E., Belcastro S., Guerra M., Calvitti M., Lilli C., Calvi E.M. & Locci P., 2006. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 21: 719-25.

Martinez G., 1991. Seasonal variations in biochemical composition of three size classes of the Chilean of the scallop, *Argopecten purpuratus Lamark*. *The Veliger.*, 17: 113-116.

Marty Y., Soudant P., Perrotte S., Moal J., Dussauze J. & Samain J.F., 1999. Identification and occurrence of a novel cis-4, 7, 10, trans-13-docosatetraenoic fatty acid in the scallop *Pecten maximus* (L.). *J. Chromatogr.*, B 839: 119-127.

Martinez G., 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Veliger.*, 34: 335-343.

Maryse D., Philippe S.T., Jeanne M., Edouard K., Yanic, M & Samaina J.F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 140, 460-470.

MATHEWS S., BHONDE R., GUPTA P.K., TOTTEY S., 2012. Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation.*, vol. 84, n°2, p. 185-192.

Mathieu M., Lubet P., 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves: a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development.*, 23: 123-129.

Matsubara T., Hayashi A., 1973. Identification of molecular species of ceramide aminoethylphosphonate from oyster adductor by gas-liquid chromatography-mass

spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.*, 296: 171-178.

Matshushiro A. & Miyashita T., 2004. Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system. *J. Bone Miner. Metab.*, 22: 163-9.

Médale F., 2009. Rapport 10^{èmes} Journées « Sciences du Muscle et Technologies des Viandes » (p.194). Rennes, France.

Meenaghan M., Natiella J., Armitage J. & Wood Rh., 1974. Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants. *J. Prosth. Dent.*, 31: 574- 579.

Mickeleit M., Wieder T., Arnold M., Geilen C.C., Mulzer J. & Reutter W., 1998. A glucosecontaining ether lipid (Glc-PAF) as an antiproliferative analogue of the platelet-activating factor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 (3): 351-3.

Milet C., Berland S., Lamghari M., Mouries L., Jolly C., Borzeix S., Doumenc D. & Lopez E., 2004. Conservation of signal molecules involved in biomineralisation control in calcifying matrices of bone and shell. *C. R Palevol.*, 3:493-501.

Mitchell D. C. & Litman B. J., 1998. Molecular order and dynamics in bilayers consisting of highly polyunsaturated phospholipids. *Biophys. J.* 74, 879-891.

Miyamoto H., Miyashita T., Okushima M., Nakano S., Morita T. & Matsushiro A., 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 9657-9660.

Miyamoto H., Yano M. & Miyashita T., 2003. Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *J. Moll. Stud.*, 69: 87-89.

Miyamoto H., Miyoshi F. & Kohno J., 2005. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zool. Sci.*, 22: 311-315.

Miyashita T., Takagi R., Miyamoto H. & Matsushiro A., 2002. Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca: Bivalvia). *The Veliger.*, 45: 250-255.

Murzina Svetlana A, Nefedova Zinaida A, Stig Falk-Petersen, Pauli O. Ripatti, Tatiana R. Ruokolainen, Svetlana N Pekkoeva & Nina N Nemova ; 2013. Lipid Status of the Two High Latitude Fish Species, *Leptoclinus maculatus* and *Lumpenus fabricii*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(4): 7048-7060.

Mortensen S.H., Børshein K.Y., Rainuzzo J.R. & Knutsen G., 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122: 173-85.

Morais S., Boaventura D., Narciso L., Re P., Hawkins S.J., 2003. Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 294: 61–80.

Mosmann T., 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods.*, 65(1-2): 55-63.

Moyad M.A., 2005. "An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: part I." *Urol. Oncol.*, 23(1): 28-35.

Moutahir-Belgasmi F., Balmain N., Lieberherr M., Borzeix S., Berland S., Barthelemy M., Peduzzi J., Milet C., Lopez E., 2001. Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 12: 1-6.

Munro M.H., Luibrand R.T. & Blunt J.W., 1987. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. *Bioorganic marine. Chemistry.*, 1: 93-176.

Müller A.M., Mehrkens A., Schafer D.J., Jaquiery C., Guven S., Lehmicke M., Martinetti R., Farhadi I., Jakob M., Scherberich A., Martin I., 2010. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater.*, 19:127-35.

Murakami-Murofushi K., Shioda M., Kaji K., Yoshida S. & Murofushi H., 1992. Inhibition of eukaryotic DNA polymerase α with a novel lysophosphatidic acid (PHYLPA) isolated from myxamoebae of *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem.*, 267 (30): 21512-7.

Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Onimura K., Matsumoto M., Shioda M., Yoshida S., Shoji M. & Murofushi H., 1995. Selective inhibition of DNA polymerase- α family with chemically synthesized derivatives of PHYLPA, a unique *Physarum* lysophosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta.*, 1258 (1): 57-60.

Murphy K. J., Mooney B.D., Mann N. J., Nichols P.D. & Sinclair A. J., 2002. Lipid, FA, and Sterol Composition of New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Lipids.*, 37: 587–595.

Murshid S.A., Kamioka H., Ishihara Y., Ando R., Sugawara Y. & Takano-Yamamoto T., 2007. Actin and microtubule cytoskeletons of the processes of 3D-cultured MC3T3-E1 cells and osteocytes. *J Bone Miner Metab.*, 25: 151-8.

Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K. & Rodwell V.W.W., 1999. Biochimie. Edition Mc Hill. International. 24^{ième} Edition: 871.

Muschler G .F., Nakamoto C. & Griffith L. G., 2004. Engineering principles of clinical cellbased,tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.*, 86-A: 1541-58.

N

Nagan N.& Zoeller R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.*, 40, 199-229.

Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., & De Crombrughe B., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.*, 108, 17-29.

Nalan Gokoglu, Mehmet Gokoglu & Pinar Yerlikaya; 2006. Seasonal variations in proximate and elemental composition of pearl oyster (*Pinctada radiata*, Leach, 1814). *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 86: 2161–2165.

Napolitano G.E., MacDonald B.A., Thompson R.J., Ackman R.G., 1992. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Mar. Biol.*, 113:71– 76.

Navarro E., Iglesias J.I.P. & Larranaga A., 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Mar. Biol.*, 101: 503-511.

Nefussi J.R., Boy-Lefèvre M.L., Boulekbache H. & Forest N., 1985. "Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion", *Differentiation*, 29: 160-168.

Nefussi J.R., Septier D., Collin P., Goldberg M. & Forest N., 1989. "A comparative ultrahistochemical study of glycosaminoglycans with cuproinic blue in bone formed in vivo and in vitro", *Calcif. Tissue Int*, 44: 11-19.

Nefussi J.R., Sautier J.M. & Forest N., 1993. "Modèle de culture et concept de surface osseux", *C. R. Soc. Biol*, 187:1-13.

Nefussi J.R., Bramia G., Modrowski D., Oboeufa M. & Foresta N., 1997. "Sequential Expression of Bone Matrix Proteins during Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro", *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.*, 45: 493-504.

Nichols D.S, Nichols P.D & Sullivan C.W., 1993. Fatty Acid, Sterol and Hydrocarbon Composition of Antarctic Sea Ice Diatom Communities During the Spring Bloom in McMurdo Sound, *Antarctic Sci.*, 5:271–278.

Nordsletten L., 2006. Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery. *Curr Med Res Opin* 22 Suppl 1: S13-7; S23.

Notami P.N & Jayant K., 1987. Rôle of diet in upper aerodigestive tract Cancers. *J. Nut.*, 10:103-113.

O

O'Connor W.A. & Lawler N.F., 2004. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Roding. *Aquaculture.*, 229: 493–506.

Ohta K., Hanashima S., Mizushina Y., Yamazaki T., Saneyoshi M., Sugawara F. & Sakaguchi K., 2000. Studies on a novel DNA polymerase inhibitor group, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols: inhibitory action on cell proliferation. *Mutat. Res.*, 467: 139-52.

Ojea J., Pazos A. J., Martinez D., Novoa Sanchez S .J .L . & Abad M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissue of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture.*, 238: 451-468.

Ojika M., Yoshida Y., Nakayama Y., Yamada K., 1990. Aplydilactone, a novel fatty acid metabolite from the marine mollusc *Aplysia kurodai*. *Tetrahedron Letters.*, 31, 4907-4910.

Okita M., Yoshida S., Yamamoto J., Suzuki K., Kaneyri T., Kubeto M. & Sasagawa T., 1995- n-3 and n-6 fatty acids in take and serum phospholipids fatty acid composition in middle-aged women living in rural and urban areas in okayama prefecture. *J. Nutr Sci. Vitaminol.*, 41:313-321.

- Okumus I. & Stirling H.P., 1998.** Seasonal variations in the weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L). in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture.*, 159: 249-261.
- Oldberg A.A., Franzen, et al., 1986.** "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83(23): 8819-23.
- Oliverio M.G. Gerosa. & M Cocco., 1992.** First record of *Pinctada radiata* (Bivalvia, Pteriidae) epibiont on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Chelonia, Cheloniidae). *Bollettino Malacologico.*, 28(5-12): 149-152.
- Ono K., Kaneko H., Choudhary S., 2005.** Biphasic effect of prostaglandin E2 on osteoclast formation in spleen cell cultures: role of the EP2 receptor. *J Bone Miner Res.*, 20: 23-29.
- Opolka A., Ratzinger S., Schubert T., Spiegel H.U., Grifka J., Bruckner P., Probst A., Grassel S., 2007.** Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice. *Matrix Biol.* 26:85-95.
- Orban E., Di Lena G., Navigato T., Casini I., Marzetti A. & Caproni R., 2002.** Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry.*, 77: 57-65.
- Orban E., Di Lena G., Masci M., Navigato T., Casini I., Caproni R., Gabelli L., Pellizzato M., 2004.** Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *J. Sci. Food Agr.*, 84: 1929-1938.
- Orban E., Gabriella D.L., Teresina N., Irene C., Roberto C., Generoso S. & Giuliana G., 2006.** Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, Chameleagallina, from the Adriatic sea. *Food Chemistry.*, 101: 1063-1070.
- Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M.J., 1997.** Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89:765-771.

Ozgoçmen S., Kaya H., Fadillioglu E., Aydoğan R. & Yılmaz Z., 2007. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis *Mol Cell Biochem.*, 295: 45-52.

Ozogul Y., Duysak O., Ozogul F., Özkütük A.S. & Canan Türeli; 2008. Seasonal effects in the nutritional quality of the body structural tissue of cephalopods. *J. Food Chemistry*.108: 847-852.

Owen J.M, Adron J.W., Middleton C., Cowey C.B., 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Lipids.*, 10, 528-531.

Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilning L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B.& Stein G.S., 1990. "Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In Vitro: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation during Formation of the Bone Extracellular Matrix", *J. Cell. Physiol*, 143: 420-430.

P

Page-Mc Caw A., Ewald A.J. & Werb Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(3): p. 221-33.

Paltauf F., 1983a. Biosynthesis of 1-O-(1'alkenyl)glycerolipids (plasmalogens). In: Mangold, H.K., Paltauf, F. (Eds.), Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects. *Academic Press.*, New York, pp. 107-128.

Pallary P., 1912. Catalogue des mollusques du littoral méditerranéen de l'égypte. *Mem Inst Egypte* 7: 69-207.

Palm R., 1998. L'analyse en composantes principales : principes et applications. *Notes Stat. Inform. Gembloux*, 98(2): 31 p.

Pampaloni F., Reynaud E.G. & Stelzer E.H., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8, 839-45.

Pampena D.A., Robertson K.A., Litvinova O., Lajoie G., Goldberg H.A., Hunter G.K., 2004. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J.*, 378:1083-7.

Papina M., Meziane T., van Woesik R., 2003. Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comp Biochem Physiol B* 135:533–537.

Parache A. & Masse H., 1987. Influence des facteurs du milieu sur le cycle biologique de *Mytilus galloprovincialis* en élevage sur corde, dans l'anse de Carteau (côte Méditerranéenne française). *Halictis*, 16 (sous presse ce volume).

Parker R. S. & Selivonchick D.P., 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.*, 53: 215-228.

Parmentier M., Sayed mahmoud C., Linder M. & Fanni J., 2007. Polar lipids : n-3 PUFA carriers for membranes and brain: nutritional interest and emerging processes. *Oleagineux corps Gras. Lipides.*, 14 : 224-229.

Pascaud M. & Brouard C., 1991. Acides gras polyinsaturés essentiels $\omega 6$ et $\omega 3$. Besoins nutritionnels équilibrés alimentaires. *Cah. Nutr. Diet.*, XXVI, 3: 185-191.

Patarca R., Freeman G. J., et al., 1989. "Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection." *J Exp Med* 170(1): 145-61.

Pazos A.J., Ramon G., Acosta C.P., Abad M. & Sanchez J.L., 1996. Influence of gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquaculture int*, 4: 201-213.

Pazos A.J, Ramon G., Acosta C.P., Sanchez J.L. & Abad M., 1997 (a). Lipid classes and fatty acid composition in the female gonad of *Pecten maximus* in relation to reproductive cycle and environmental variables. *Comp. Biochem. Physiol B.*, 117: 393-402.

Pazos Antonio J., Sanchez José L., Roman Guillermo., Perez-Parallé M. Luz. & Abad Marcelina; 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acids composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol B.*, 134: 367-380.

Pederson L. et al., 2008. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(52): 20764-9.

Pelham R .J .Jr. & Wang Y., 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94 : 13661-5.

Petite H., 2002. La bio-ingénierie de la régénération osseuse, *Medecine/ Science* (18), 995.

Pereira M.L., Almeida M.J., Ribeiro C., Peduzzi J., Barthélemy M., Milet C. & Lopez E., 2002. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of bivalve *Pinctada maxima*. A new insight in the biomineralization field. *Eur.J.Biochem.*, 269 :4994-5003.

Pereira-Mouries L., 2003. Etude des composants de la matrice organique hydrosoluble de la nacre de l'huître perlière *Pinctada Maxima*. Bioactivité dans le processus de régénération osseuse, Thèse Biologie et Biochimie appliquées, 163 pages.

Pernet F., Bricelj V.M., Parrish C.C., 2005. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J Exp Mar Biol Ecol.*, 327:115–133.

Perren S.M., 1979. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res.*, 138:175–96.

Perry G., Volkman J.K., Johns R.B., 1979. Fatty acid of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43: 1715-1725.

Pierre Marie; 2001. Differentiation, function and regulation of osteoblast. *Med Sci (Paris)*; 17: 1252–1259.

Pifferi F., Roux F., Langelier B., Alessandri J.M., Vancassel S., Jouin M., Lavalie M., Guesnet P., 2005. (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency Reduces the Expression of Both Isoforms of the Brain Glucose Transporter GLUT1 in Rats. *The Journal of Nutrition*, 135 : 2241-2246.

Pirini M., Manuzzi M.P., Pagliarani A., Trombetti F., Borgatti A.R., Ventrella V., 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 147 B: 616-626.

Pittenger M.F., et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.*, 284(5411): 143-7.

Palacios E., Racotta I. S., Kraffeb E., Marty b.Y., Moalc J. & Samain J. F., 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipectensubnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture.*, 250, 270-282.

Poirot J.P., 1975. Extrait de "Eléments de Gemrnologie' Institut National de Gemrnologie, Paris, 348 p.

Pollero J.R., Re M.E., Brenner R., 1979. Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64A: 257-263.

Poole C.A., 1992. Chondrons: the chondrocyte and its pericellular microenvironment. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. (S. R. Kuettner KE, Peyron JC, Hascall VC). New York, Raven Press: 201-20.

Prashad B. & Bhaduri J.L., 1933. The pearl oysters of Indian waters. *Records of Indian Museum*. 35:167-74.

Prockop D.J. & Kivirikko K.I., 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*, 64:403-34.

Przeslawski R., Bourdeau P.E., Doall M.H., Pan J., Perino L. & Padilla D.K., 2008. The effects of a harmful alga on bivalve larval lipid stores. *Harmful Algae.*, 7:802–807

Putnam A.J., Cunningham J.J., Pillemer B.B. & Mooney D.J., 2003. External mechanical strain regulates membrane targeting of Rho GTPases by controlling microtubule assembly. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 284:C627-39.

R

Ranson G., 1961. Les espèces d'huitres perlières du genre *Pinctada* (Biologie de quelques-unes d'entre elles). Mémoires, deuxième série fasc. 67, Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique : 1-95.

Raisz L.G. & Alander C.B.H.A., 1989. Simmons Effects of prostaglandin E3 and eicosapentaenoic acid on rat bone in organ culture. *Prostaglandins.*, 37: 615-625.

Reboul P., Martel Pelletier J. & Pelletier J.P., 2004. Galectin-3 in osteoarthritis: when the fountain of youth doesn't deliver its promises. *Current opinion in rheumatology.*, vol.16. n° 5, p.595-598.

Rho J.Y., Kuhn-Spearing L. & Zioupos P., 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.*, 20(2): 92-102.

Richette P., 2008. Généralités sur l'arthrose: épidémiologie et facteurs de risque. *Elsevier Masson.*, p14-003-C-20.

Rioux V., Lemarchal P., Legrand P., 2000. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. *J Nutr. Biochem.*, 11: 198-207.

Rioux V., Galat A., Jan G., Vinci F., D'Andréa S., Legrand P., 2002. Exogenous myristic acid acylates proteins in cultured rat hepatocytes. *J Nutr. Biochem.*, 13: 66-74.

Rittling S. R., Matsumoto H. N., et al., 1998. "Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro." *J Bone Miner Res.*, 13(7): 1101-11.

Robert S.A., Bennett F., Bernard J., Blanchot S., Bougrier D., Buestel X., Caisey J.C., Cochard J.M., Dormoy P., Geairon ., Jonquière G., Pellan A., Pouvreau S., Prou J., Remoissenet G., Stiger V., Teissier H. & Tiapari J ., 1995. Eude de la respiration et de la filtration de l'huitre perlière *Pinctada margaritifera*, rapport final programme général de recherche sur la nacre.

Robinson W.E., Penington M.R., Langton R.W., 1981. Variability of tubule types within the digestive glands of *Mercenaria mercenaria*(L.), *Ostrea edulis* (L.) and *Mytilus edulis* (L.) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 54: 265-276.

Robinson A., 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg): I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *J. Shellfish Res.*, 11: 437-441.

Robinson D. R., Xu L.L., Tateno S., Guo M. & Covin R.B., 1993. Suppression of autoimmune disease by dietary n-3 fatty acids. *J. Lipid Res.*, 34, 1435-1444

Rouwkema J., 2007. Prevascularized bone tissue engineering. University of Twente. Twente.

Rousseau M., Plouguerné E., Wan G., Wan R., Lopez E. & Fouchereau-Peron M., 2003. Biomineralisation markers during a phase of active growth in *Pinctada margaritifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.*, 135: 271–27.

Rousseau M., Lopez E., Couté A., Mascarel G., Smith D.C., Naslain R. & Bourrat X., 2005. Sheet nacre growth mechanism: a Voronoi model. *Journal of Structural Biology*, 149: 149–157.

Rousseau M., Laurent B., Elian L., Philippe G.K.L.N., Lopez E., 2006. Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comp Biochemistry and Physiology, Part B.*, 145:1-9.

Rousseau M., Boulzaguet H., Biagianti J., Duplat D., Milet C., Lopez E. & Bedouet L., 2007. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. *Journal Of Biomedical Materials Research, Part A.*, p. 487- 497.

Rousseau M., Boulzaguet H., Biagianti J., Duplat D., Milet C., Lopez E., Bedouet L., 2008. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 85: 487-97.

Rousseau M., Meibom A., Gèze M., Bourrat X., Angellier M. & Lopez., 2009. Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Journal of Structural Biology.*, 165: 190–195.

Rousseau M., 2011. Nacre, a natural biomaterial. biomaterials applications for nanomedicine, p. 281-298.

Rosa R., Costa P.R., Pereira J. & Nunes M.L., 2004. Biochemical dynamics of spermatogenesis and oogenesis in *Eledone cirrhosa* and *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Comp. Biochem. and Physiol.*, 139: 299-310.

Rossert J., Brideau G., Terraz C., Lejard V., 2003. Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I. « In » *Flammarion Médecine-Sciences.*, p. 47-62

Royce P.M., 2003. Collagen: the collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix.

Roy T.D., Simon J.L., Ricci J.L., Rekow E.D., Thompson V.P. & Parsons J.R., 2003. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A.*, 66:283-91.

Royette C.E., Calder P.C. & Dupertuis Y.M., 2004. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr.*, 23: 139-151.

Ruano F., Ramos P., Quaresma M., Maria Bandarra N. & Pereira da Fonseca I., 2012. Evolution of fatty acid profile and Condition Index in mollusc bivalves submitted to different depuration periods. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias.*, 111 : 75-84.

Ruhe P.H., Kroese-Deutman, Wolke J., Spauwen P. & Jansen J., 2004. Biomaterials. 25 (11Mai) 2123–2132.

Rustad K.C., Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Major M.R., Rajadas J., Longaker M.T.& Gurtner G.C., 2011. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. Biomaterials.

S

Sabelli B., 1969. Ritrovamenti malacologici a Pantellaria e nei banchi di pesca tunisini. *Conchiglie.*, 5: 3-11.

Saito H., 2004. Lipid and FA Composition of the Pearl Oyster *Pinctada Fucatamartensii*: Influence of Season and Maturation. *Lipids.*, 39:997-1005.

Sandell L.J. & Adler P., 1999. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci.*, 4:p. D731-42.

Salasznyk R.M. & Williams W.A., 2004. "Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *J Biomed Biotechnol.*, 1: 24-34.

Samuelsson B.,1987. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs.*, 33, 2-9.

Santos I., 2003. De la nacre pour régénérer l'os. Le guide de la médecine et de la santé au Maghreb, Revue de la presse de la santé : Albayane –Maroc, 2003.

Sargent J.R., 1989. Ether-linked glycerides in marine animals. In: Ackman, R.G. (Ed.), Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils. *CRC Press, Boca raton, Florida, USA.*, pp. 175–197.

Sargent J.R., Bell J.G., Bell M.V., Henderson R.J. & Tocher D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology.*, 11:183–198.

Sarikaya K., Wickramasinghe. & Isaacson M., 1994. Détermination de l'échelle nanométrique propriétés physiques des matériaux par microscopie et spectroscopie, Proc. Des matériaux Research Society Symposium, *Materials Society Research, Pittsburgh.*, Vol.332,700p.

Sastry A.N., 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese, J.C., Pearse, J.S., (eds) Reproduction of marine invertebrates, Vol V. *Academic Press, New York.*, p 113-292.

Saucedo P., Racotta I., Villarreal H. & Monteforte M., 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland and muscle of the Calafia mother of pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *Jour. Shellfish Resear.*, 21(1): 127-135.

Scherberich A., Galli R., Jaquiery C., Farhadi J., Martin I., 2007. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells.*, 25:1823-9.

Scherrer L.A. & Gross R.W., 1989. Subcellular distribution, molecular dynamics and catabolism of plasmalogens in myocardium. *Mol. Cell. Biochem.*, 88: 97-105.

Schwartz Z.J., 2000. Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am. J. clin Nutr.*, 71 (1 suppl): 393-396.

Schimming R. & Schmelzeisen R., 2004. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.*, 62: 724-9.

Sedel L. & Janot C., 2001. Biomatériaux: Cahier des charges de l'INSERM.

Seed R., 1971. A physiological and biochemical approach of the taxonomy of *Mytilus edulis* (L) and *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) from S.W of England. *Cahiers boil.Mar. Roscoff.*, 12(3):291-322.

Seifert Mark F. & Watkins Bruce A., 1997. Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism. *Nutrition Research ., N 7,17:* 1209-1228.

Senger D. R., Wirth D. F. et al., 1979. "Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins." *Cell.*, 16(4): 885-93.

Serbetis C.D., 1963. L'acclimatation de la Meleagrina (*Pinctada*) margaritifera (Lam.) en Grèce. *Ciesm.*, 17 (2): 271-272.

Serhan C.N., Gotlinger K., Hong S. & Arita M., 2004. Resolvins, Docosatrienes and neuroprotectins, novel ω -3 derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostag. Other Lipid Mediators.*, 73, 155-172.

Seurat L.G., 1929. La petite Pintadine de Golf de Gabès. *Bull.Trav.Stat.Aquocult.Pêche.de Castiglione.*, 1er fascicule: 11-27.

Shapiro F., 1988. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am.*, 70:1067–81.

Shaikh S.R., Cherezov V., Caffrey M., Stillwell W., Wassall S.R., 2003. Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry.*, 42: 12028-12037.

SHEN G., 2005. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & Craniofacial Research.*, vol. 8, p. 11-17.

Shen G. & Darendeliler M.A., 2005. The adaptive remodeling of condylar cartilage:a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res.*, 84:691-699.

Shewfelt R.L., 1981. Fish muscle lipolys, a review. *J.Foo. Biochem.* 5: 79-100.

Shieh H.S., 1968. The characterization and incorporation of radioactive bases into scallop phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27, 533-541.

Shirai S., 1994. Pearls and pearl oysters of the world. Marine Planning Compagny, Okinawa, Japon 108p.

Shukunami C., Shigeno C., Atsumi T., Ishizeki K., Suzuki F., Hiraki Y., 1996. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Journal of cell biology.*, vol.133, n°2, p 487-68.

Silve C., Lopez E. & Vidal B., 1992. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. *Calcif Tissue Int.*, 51:363-369.

Sims N.A. & Gooi J.H., 2008. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.*, 19(5): 444-51.

Simon J.A., Hodgkings M.L., Brouner W.S., Neuhans J.M., Bernernt J.T. & Huilleys B., 1995. Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Am. J. Epidemiol.*, 142: 469-476.

Simbulan C.M., Taki T., Tamiya-Koizumi K., Suzuki M., Savoysky E., Shoji M. & Yoshida S., 1994. Sulfate- and sialic acid-containing glycolipids inhibit DAN polumerase a activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1205: 68-74.

Simopoulos A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedecine & Pharmacotherapy.*, 56 (8): 365-79.

Smits P., Li P., Mandel J., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B. & Lefebvre V., 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, 1:277-290.

Schäffer T.E., Ionescu-Zanetti C. & Proksch R., 1997. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or growth through mineral bridges? *Chem. Matter.*, 9: 1731-1740.

Soudant P., Marty Y., Moal J. & Samain J.F., 1995. Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *J. Chromatogr.*, B 673: 15-26.

Soudant P., Moal J., Marty Y., Samain J.F., 1996. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 205: 149-163.

Soudant P., Moal J., Marty Y. & Samain J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.) Effect of nutrition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 215:103-114.

Soudant P., Marty Y., Moal J., Masski H. & Samain J.F., 1998. Fatty Acid Composition of Polar Lipid Classes During Larval Development of Scallop *Pectenmaximus* (L.), *Comp.Biochem. Physiol.*, 121:279–288.

Southgate Paul; 2007. Influence du site sur la croissance et la qualité de la nacre de l'huître perlière Akoya dans le sud-est de l'Australie) L'Huître perlière – Bulletin de la CPS n°17 – Février 2007.

Sournia A. & Ricard M., 1976. Données sur l'hydrologie et la productivité du lagon d'un atoll fermé (Takapoto, lies Tuamotu). *Vie et milieu*, Vol. XXVI, fasc 2, sér. B : 243-279.

Speer M.Y., Chien Y.C., Quan M., Yang H.Y., Vali H., McKee M.D., Giachelli C.M., 2005. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification *in vitro*. *Cardiovasc Res* 66:324-33.

Stamm M., 2008. (ed.), In: *Polymer Surfaces and Interfaces* 299 Chapter DOI: 10.1007/978-3-540-73864-0_15, Springer.

Stanley D., Howard R., 1998. The biology of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates: cellular, organismal and ecological actions. *Am. Zool.*, 38: 369-381.

Stein G.S., Lian J.B., Owen T.A., 1990. "Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation", *FASEB J*, 4: 3111-3123.

Steinert A.F., Ghivizzani S.C., Tuan R.S., Evan C.H., Nöth U., 2007. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage, *Arthritis Res Ther.*, 9: 213.

Stevens T.J., Arkin I.T., 2000. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins*, 39: 417-420.

St-Jacques B., Hammerschmidt M. & McMahon A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 13: 2072-2086.

Stillwell W. & Wassall S. R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acids. *Chem.Phys. Lip.* 126, 1-27.

Stock U.A.J.P., 2001. Vacanti. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.*, 52: 443-51.

Stroncek J.D. & Reichert W.M., 2008. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types.

Stubling D. & Hagen W., 2003. Fatty acid biomarker ratios—Suitable trophic indicators in Antarctic euphausiids? *Polar Biol.*, 26:774–782.

Svetlana A., Murzina, Zinaida A., Nefedova, Stig Falk-Petersen, Pauli O., Ripatti, Tatiana R., Ruokolainen, Svetlana N., Pekkoeva & Nina Nemova N., 2013. Lipid Status of the Two High Latitude Fish Species, *Leptoclinus maculatus* and *Lumpenus fabricii*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7048-7060; doi:10.3390/ijms14047048.

Swift M.L., 1977. Phosphono-lipid content of the oyster, *Crassostrea virginica*, in the three physiological conditions. *Lipids.*, 12: 449-451.

Sudo K.F.J., Monsma Jr. & Kattsenellenbogen B.S., 1983. Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor. Subcellular localization, ligand specificity and distribution in tissues of the rat. *Endocrinology.*, 112: 425-434.

Sundelacruz S. & Kaplan D.L., 2009. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol.*, 20:646-55.

T

Takahashi Y. & Tabata Y., 2004. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 15: 41-57.

Takamizawa S., Maehata Y., Imai K., Senoo H., Sato S. & Hata R., 2004. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int*, 28:255-65.

Takeuchi T. & Endo K., 2005. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotech.*, 8: 52-61.

Tare R. S., Howard D., Pound J. C., Roach H. I. & Oreffo R. O. C., 2005. ATDC5: an Ideal Cell Line for Development of Tissue Engineering Strategies Aimed at Cartilage. Generation *European Cells and Materials.*, Vol. 10. Suppl. 2, page 22.

Telahigue K., Chetoui I., Rabeh I., Romdhane M.S. & El Cafsi M., 2010. Comparative fatty acid profiles in edible parts of wild scallops from the Tunisian coast, *Food Chemistry.*, 122: 744–746.

Thaler A., Hottkowitz T. & Eibl H., 2000. Separation and quantification of alkylphosphocholines by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Phys. Lipids.*, 107: 131-139.

Taylor A.C. & Venn T.J., 1979. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissue of the queen Scalopp *Chlamys opercularis* from the Clyde Sea area. *Journ. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 59:605-621.

Telahigue K., Chetoui I., Rabeh I., Romdhane M. S & El Cafsi M. 2010. Comparative fatty acid profiles in edible parts of wild scallops from the Tunisian coast. *Food Chemistry*, 122, 744–746.

The Pearl book, page 23.

Tlig-Zouari S., 1993. Contribution à l'étude ecobiologique de deux espèces de mollusques Lamellibranches *Pinctada radiata* (Leach, 1814) et *Pinna nobilis*, (Linné 1758) des Iles Kerkennah. Thèse de Doctorat, 215p. Fac. Sci. Tunis. Tunisie.

Tlig Z., Zouari J., 1994. Reproduction of *Pinctada radiata* in Kerkennah Islands (Tunisia). *J Marine Life.*, 4, 41-45.

Tlig Zouari S. & Zaouali J., 1998. Etude de quelques caractères biométriques de *Pinctada radiata* des îles Kerkenah (Tunisie). *Annales de l'Institut Océanographique.*, Paris 2, 217–224.

Tocher D.R. & Sargent J.R., 1984. Analyses of lipid and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids.*, 19 : 492–499.

Tocher D.R., Carr J. & Sargent J.R., 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 94:367-374.

Tocher D.R., Dick J.R. & Sargent J.R., 1995. Occurrence of 22:3n- 9 and 22:4n- 9 in the lipids of the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatic tumor cell line, PLHC-1. *Lipids.*, 30: 555-565.

Tomlin J.R., 1927. Report on the Mollusca (Amphineura, Gastropoda, Scaphopoda, Pelecypoda). *Transactions of the Zoological Society of London.*, 22: 291-320

Thompson P.A., Harrison P.J., 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Mar. Biol.*, 113: 645-654.

Toppets V., Pastoret, De Behr V., Antoine N., Dessy C. & Gabriel A., 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales Médicales Vétérinaires.*, 148 :1-13.

Tortora G. & Derrickson B., 2007. Principes d'anatomie et de physiologie. 4ème ed.

Tranter D.J., 1958b. Reproduction in Australian Pearl Oysters (lamellibranchia). IV. *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). *Austr. J. Mar. Freshw. Research*, 9: 509-525.

Trider D.J. & Castell J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.*, 110: 1303-1309.

Tsiridis E., Upadhyay N. & Giannoudis P., 2007. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 38 Suppl, 1:S11-25.

Tsutsumi T., Tokumura A. & Kitazawa S., 1998. Undifferentiated HL-60 cells internalize an antitumor alkyl ether phospholipid more rapidly than resistant K562. *cells. Biochim. Biophys. Acta.*, 1390: 73-94.

Tsutsumi R., Xie C., Wei X., 2009. PGE2 signaling through the EP4 receptor on fibroblasts upregulates RANKL and stimulates osteolysis. *J Bone Miner Res.*, 24: 1753-1762.

Tunnicliffe V., McArthur A.G., McHugh D., 1998. A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Adv. Mar. Biol.*, 34: 353-442.

U

Ueta C., Iwamoto M., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Enomoto-Iwamoto M., Ohmori T., Enomoto H., Nakata K., Takada K., Kurisu K. & Komori T., 2001. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol*, 153: 87-100.

Uki N., Sugiura M. & Watanabe T., 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52:1013-1023.

Ulrike Grienke, Joe Silke & Deniz Tasdemir; 2014. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human Health. *Food Chemistry.*, 142: 48–60

Unger C. & Eibl H., 1991. Hexadecylphosphocholine: preclinical and first clinical results of a new antitumor drug. *Lipids*, 26 (21): 1412-6.

V

Vaes G., 1988. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.*, 198 ; 239-71.

Vallée Christine, 2012. Bioaragonite ou nacre Régénération des os et du cartilage. *Cabines 251.*, 48-50.

Vaskovsky V.E., 1989. Phospholipids. In: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*. CRC Press, Boca Raton, Florida., pp. 199-242.

Vassel E., 1899. La pintadine de Vaillant et l'acclimatation de la mère-perle sur le littoral tunisien. *Journal of Conchology.*, 57 (3): 416-419.

Veylon R., 1977. La mer, source de médicaments. *La nouvelle presse médicale.*, 6 (26) : 2353-6.

Vijayan S., Bentley G., Briggs Twr., Skinner Ja., Carrington Rwj., Pollock R. & Flanagan Am., 2010. Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques. *Indian Journal Of Orthopaedics.*, Vol. 44, N°3, P. 238-245

Violaine C., 2000. les Biomatériaux. La Fondation pour la Recherche Médicale www.frm.org.

Vinatier C., Bordenave L., Guicheux J. & Amedee J., 2011. Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering. *Med Sci (Paris).*, 27:289-96.

Vogel V. & Sheetz M., 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7, 265-75.

W

Waldock M.J., Holland D. L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids.*, 19: 332-336.

Wang D., K. Christensen, et al., 1999. "Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* & *in vivo* differentiation/mineralization potential." *J Bone Miner Res.*, 14(6): 893-903.

Wang Xiaoyan , Liu Shangfeng , Xie Liping , Zhang Rongqing , Wang Zhao, 2011 *Pinctada fucata* mantle gene 3 (PFMG3) promotes differentiation in mouse osteoblasts (MC3T3-E1). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 158 :173–180.

Wassall S.R., Brzustowicz M.R., Shaikh S.R., Cherezov V., Caffrey M., Stillwell W. 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids*, 132 : 79-88.

Watanabe T., Izquierdo M.S., Takeuchi T., Satoh S. & Kitajima C., 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkai.*, 55:1635–1640.

Watzek G., Zechner W., Ulm C., Tangl S. & Tepper G., 2005. Histologic and histomorphometric analysis of three types of dental implants following 18 months of occlusal loading : a preliminary study in baboons . *Clin Oral Implants Res.*, 16: 408-416.

Watkins B.A., Lippman H.E., Le Bouteiller L., Li Y. & Seifert M.F., 2001. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog. Lipid Res.*, 10: 125-48.

Watkins Bruce A., Li Yong , Lippman Hugh E. & Seifert Mark F.,2001. Omega-3Polyunsaturated Fatty Acids and Skeletal Health. *Exp Biol Med* , v 226 , 6: 485-497.

Wauquier Fabien, Véronique Coxam, Yohann Wittrant; 2011. Nutrition lipidique, inflammation et tissu osseux. *Nutrition – Santé.*, 0365.

Wauquier F., Philippe C., Léotoing L., Mercier S., Davicco M-J., Lebecque P., Guicheux J., Pilet P., Miot-Noirault E., PoitoutV., Alquier T., Coxam V. & Wittrant Y., 2013. The free fatty acid receptor g protein-coupled receptor 40 (GPR40) protects from bone loss through inhibition of osteoclast differentiation. *The journal of biological chemistry.*, vol. 288, 9: 6542–6551.

Weiner S., W. Traub, and H.D Wagner; 1999. Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol.*, 126(3): p. 241-55.

Weiss L.A., Barrett-Connor E., Von Mühlen D., 2005. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr*; 81(4) : 934-8.

WHO/FAO ; 1977. Dietary fats and oils in human nutrition. Report of an expert consultation..

Whyte J.N.C., Englar J.R. & Carswell B.L., 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture.*, 90:158-172.

Widdig A., Schlichter D., 2001. Phytoplankton: a significant trophic source for soft corals? *Helgol Mar Res.*, 55:198–211.

Wieder T., Orfan C.E. & Geilen C.C., 1998. Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J. Biol. Chem.*, 273 (18): 11025-31.

Westbroek P. & Marin F., 1998. A marriage of bone and nacre. *Nature.*, 392: 861-862.

Wigmore S.J., Ross J.A., Falconer J.S., Plester C.E., Tisdale M.J., Carter D.C. & Fearon K.C., 1996. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition.*, 12 (1 Suppl): 27-30.

Wuelling M., Vortkamp A., 2010. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr. Nephrol.*, 4 : 625-31.

Wu J.Z. & Herzog W., 2006. Analysis of the mechanical behaviour of chondrocytes in uncon_ ned compression tests for cyclic loading. *Journal of Biomechanics.*, 39: 603-616.

Wu X. et al., 2003. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology.*, 144(12): 5545-55.

X

Xiao G., Jiang D., Thomas P., Benson M.D., Guan K., Karsenty G. & Franceschi R.T., 2000. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem.*, 275: 4453-9.

Ximenes Da Silva A., Lavielle F., Gendrot G., Guesnet P., Alessandri J.M., Lavielle M., 2002. Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem*, 81: 1328-1337.

Y

Yamate T., Mocharla H., Taguchi Y., Igietseme J.U., Manolagas S.C., Abe E., 1997. Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology.*, 138:3047-55.

Yan Z., Jing G., Gong N., Li C., Zhou Y., Xie L. & Zhang R., 2007. N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite *in vitro*. *Biomacromolecules.*, 8: 3597-3601.

Yann Brassaglia, 2004. Biologie Cellulaire 2e édition, collection "Sciences fondamentales", édition Maloine, p.7-8, ISBN 2 224 02862 8.

Yassien M.H., 1998. Biological and ecological studies on the pear oyster, *Pinctada radiata* (Mollusca, Lamellibranchia) from the Red Sea, with special reference to its tolerance to water pollution. PhD Thesis, Faculty of Science, Ain Sharm University, 191p.

Yassien M.H., Abdel Razek F.A. & Kilada R.W.,2000. Growth estimates of the pearl oyster, *Pinctada radiata*, from the Eastern Mediterranean. *Egypt. Jour. Aquat. Boil & Fish.*, 4:105-118.

Yongmanitchai W. & Ward O.P., 1989. Omega-3 fatty acids: Alternative sources of production. *Process. Biochem.*, 117-25.

Yunzhi Yang, Renee Glover & Joo L., 2003. Ong, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 30 (4): 291–297.

Yu D.H., Chu K.H., 2006-a. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China. *Aquaculture.*, 258: 220-227.

Yu D.H. & Chu K.H., 2006-b. Species identity and phylogenetic relationship of the pearl oysters in *Pinctada* Roding, 1798 based on ITS sequence analysis. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 34: 240-250.

Yutian Shen, Jing Zhu, Hongbiao Zhang, Fei Zhao, 2006. In vitro osteogenetic activity of pearl. *Biomaterials.*, Volume 27, Issue 2: 281–287.

Z

Zakhartsev M.V., Naumenko N.V. & Chelomin V.P., 1998. Non-methylene interrupted fatty acids in phospholipids of the membranes of the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Russ. J. Mar. Biol.*, 24: 183-6.

Zandee D.I. , Lluytmans J.H. & Zurburg W., 1980. Seasonal variations in biochemical composition of *M. edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Neth.J Sea Res.*, 14:1-29.

Zanette Y. & Deslous-Paoli J.M., 1983. Intérêt du prélevage de l'huître *Crassostrea gigas* en claire. *Science et pêche, Bull. Inst. Pêche Marit.*, n333 :11-15.

Zhang Y., Gao F., Popov V.L., Wen J.W., Hamill O.P., 2000. Mechanically gated channel activity in cytoskeleton deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 523: 117-130.

Zaouali J., 1978. Les peuplements malacologiques de la mer de Bou Ghrara. *Bull. off. Natn. Pêche. Tunisie.*, 2: 199-209.

Zaouali J. & Beaten S., 1985. Etude des peuplements macrobenthiques de la zone centrale et du bassin oriental de la mer des Bibans (Tunisie méridionale) par la méthode de l'analyse factorielle des correspondances. *Rapp. Comm. Int. Mer. Med.*, 29(4): 199-203.

Zaremba C.M., Morse D.E., Mann S., Hansma P.K. & Stucky D.S., 1998. Aragonite hydroxyapatite conversion in gastropod (abalone) nacre. *Chem. Mater.*, 10:3813-3824.

Zeisel S.H., Mar M.H., Howe J.C. & Holden J.M., 2003. Concentration of choline containing compounds and betaine in common foods. *J. Nut.*, 133: 1302-1307.

Zhukova N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of, non-methylene- interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110(B): 801-804

Zibrowius H., 1992. Ongoing modification of the Mediterranean marine flora and fauna by the establishment of exotic species. *Mésogée.*, 51: 83-107.

Ziegler R.G., Morris L.E., Blot W.J., Pottern L.M., Hoover R. & Fraumeni J.F.J.R., 1981. Oesophageal cancer among black men in Washington, D.C .II. Role of nutrition. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 67:1199-1206.

Zouari S., 1985. Contribution à l'étude systématique des Lamellibranches des côtes tunisiennes. DEA. 245p. Fac. Sci. Tunis.

Zhukova N.V., 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from [14C] acetate in molluscs. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, 878: 131-133.

Zhukova N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 100: 801-804.

Zhukova N.V., Aizdaicher N.A., 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine macroalgae. *Phytochemistry.*, 39: 351–356.

Zhukova N.V., 2007. Lipid classes and fatty acid composition of the tropical Nudibranch mollusks *Chromodoris sp.* and *Phyllidia coelestis*. *Lipids*, 42: 1169-75.

Zlatanos S., 2008. Seasonal variation in the fatty acid composition of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in N.Greece. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.*, 7 (6): 3015-3019.

Documents électroniques

<http://dossier.univ-st-etienne.fr/lbto/www/tissu-osseux/index.html> Dr Lafage-Proust.

Annexes

Annexe (1). Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides totaux chez *Pinctada radiata* (moyenne \pm ES; $n = 6$). a,b,c – valeurs dans les lignes ayant des indices de lettre différent de façon significative, $P \leq 0.05$.

%	Hiver	Printemps	Eté	Automne
C14:0	6.06 \pm 0.46 ^a	6.84 \pm 1.18 ^a	6.53 \pm 0.69 ^a	5.79 \pm 1.1 ^a
C15:0	0.27 \pm 0.11 ^b	0.53 \pm 0.04 ^b	1.24 \pm 0.04 ^a	1.16 \pm 0.11 ^a
C16:0	34.00 \pm 1.23 ^a	28.50 \pm 3.02 ^{ab}	31.91 \pm 1.62 ^{ab}	25.76 \pm 1.47 ^b
C17:0	0.03 \pm 0.01 ^b	0.50 \pm 0.04 ^b	0.47 \pm 0.04 ^b	1.52 \pm 0.41 ^a
C18:0	12.65 \pm 1.74 ^a	8.71 \pm 0.78 ^a	10.48 \pm 0.49 ^a	11.19 \pm 0.53 ^a
C22:0	1.56 \pm 0.16 ^a	2.24 \pm 0.58 ^a	1.45 \pm 0.12 ^a	1.67 \pm 0.11 ^a
C14:1	0.79 \pm 0.05 ^a	0.10 \pm 0.09 ^a	1.00 \pm 0.11 ^a	0.84 \pm 0.06 ^a
C15:1	0.28 \pm 0.06 ^b	0.69 \pm 0.17 ^{ab}	0.88 \pm 0.12 ^a	0.58 \pm 0.1 ^{ab}
C16:1n-7	3.59 \pm 0.78 ^a	3.82 \pm 0.5 ^a	4.56 \pm 0.41 ^a	3.68 \pm 0.68 ^a
C18:1n-7	trace	Trace	trace	trace
C18:1n-9	2.80 \pm 0.24 ^b	4.01 \pm 0.42 ^a	2.32 \pm 0.16 ^b	3.17 \pm 0.29 ^{ab}
C20:1n-9	1.40 \pm 0.18 ^a	0.81 \pm 0.55 ^{ab}	0.86 \pm 0.09 ^{ab}	0.13 \pm 0.05 ^b
C22 :1n-9	trace	Trace	trace	trace
C18:2n-6	1.88 \pm 0.16 ^a	2.39 \pm 0.22 ^a	1.95 \pm 0.17 ^a	1.57 \pm 0.3 ^a
C20:2n-6	1.18 \pm 0.4 ^a	7.92 \pm 7.10 ^a	4.77 \pm 4.22 ^a	4.88 \pm 3.15 ^a
C20:4n-6	4.88 \pm 0.5 ^{ab}	3.69 \pm 0.51 ^b	5.60 \pm 1.14 ^{ab}	7.44 \pm 0.57 ^a
C18:3n-3	0.29 \pm 0.12 ^b	1.50 \pm 0.51 ^a	1.04 \pm 0.06 ^{ab}	0.9 \pm 0.09 ^{ab}
C18:4n-3	1.01 \pm 0.09 ^a	0.59 \pm 0.27 ^{ab}	0.58 \pm 0.10 ^{ab}	0.25 \pm 0.13 ^b
C20:4n-3	0.32 \pm 0.04 ^a	0.25 \pm 0.09 ^a	0.24 \pm 0.15 ^a	0.24 \pm 0.06 ^a
C20:5n-3	5.78 \pm 0.71 ^a	4.18 \pm 0.38 ^a	4.19 \pm 0.43 ^a	4.18 \pm 0.42 ^a
C22 :3n-3	trace	Trace	trace	trace
C22:5n-3	0.92 \pm 0.1 ^a	2.18 \pm 0.51 ^a	1.30 \pm 0.1 ^a	5.45 \pm 3.32 ^a
C22:6n-3	16.04 \pm 0.82 ^a	15.87 \pm 2.85 ^a	14.37 \pm 0.9 ^a	13.94 \pm 0.75 ^a
C16:2n-4	2.49 \pm 0.12 ^a	1.92 \pm 0.15 ^a	2.14 \pm 0.11 ^a	2.77 \pm 0.61 ^a
C16:3n-4	0.53 \pm 0.03 ^a	0.29 \pm 0.06 ^b	0.25 \pm 0.06 ^b	0.65 \pm 0.05 ^a
C18:3n-4	0.39 \pm 0.1 ^b	1.35 \pm 0.24 ^a	0.49 \pm 0.14 ^b	0.31 \pm 0.14 ^b
C22:2i	0.40 \pm 0.19 ^b	0.72 \pm 0.32 ^{ab}	1.16 \pm 0.08 ^{ab}	1.59 \pm 0.45 ^a
C22:2j	0.30 \pm 0.15 ^a	0.27 \pm 0.13 ^a	0.07 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a
AG (mg/100g)				
AGS	214.06 \pm 21.23 ^a	168.37 \pm 50.15 ^{ab}	97.93 \pm 7.04 ^{bc}	37.93 \pm 4.55 ^c
AGMI	36.32 \pm 7.33 ^a	32.71 \pm 9.82 ^a	18.18 \pm 1.60 ^{ab}	6.90 \pm 1.26 ^b
AGPI	149.82 \pm 23.07 ^a	133.18 \pm 22.82 ^a	70.95 \pm 2.51 ^b	34.77 \pm 2.19 ^b
AGI	186.14 \pm 29.4 ^a	165.90 \pm 29.66 ^a	89.13 \pm 3.64 ^b	41.67 \pm 2.43 ^b
n-3	100.21 \pm 15.35 ^a	79.63 \pm 18.37 ^a	40.87 \pm 3.31 ^b	19.64 \pm 2.18 ^b
n-6	32.88 \pm 5.78 ^a	38.67 \pm 15.83 ^a	22.38 \pm 4.53 ^a	10.68 \pm 2.08 ^a
EPA+DHA	89.75 \pm 13.75 ^a	64.97 \pm 15.66 ^{ab}	34.87 \pm 3.03 ^{bc}	14.39 \pm 1.28 ^c
n-3/n-6	3.12 ^a	3.11 ^a	2.13 ^a	2.15 ^a
AGPI/AGS	0.70 ^a	0.79 ^a	0.72 ^a	0.91 ^a
C16 :0/C18 :1n-9	50.02 ^a	7.13 ^b	19.90 ^b	8.32 ^b
AA/AL	2.58 ^a	1.59 ^a	2.74 ^a	10.06 ^a
C16 :0/C18 :0	2.89 ^a	3.38 ^a	3.05 ^a	2.33 ^a

Annexe (2). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PC chez *Pinctada radiata*
(moyenne \pm ES; $n = 6$).

%	Hiver	Printemps	Été	Automne
C14:0	1.66 \pm 0.08 ^c	3.13 \pm 0.18 ^b	4.12 \pm 0.65 ^{ab}	4.66 \pm 0.21 ^a
C15:0	0.78 \pm 0.04 ^b	1.27 \pm 0.09 ^b	1.96 \pm 0.7 ^b	3.12 \pm 0.21 ^a
C16:0	33.59 \pm 1.54 ^{ab}	39.29 \pm 1.64 ^a	30.27 \pm 4.49 ^{ab}	27.54 \pm 1.38 ^b
C17:0	2.32 \pm 0.42 ^b	0.93 \pm 0.13 ^b	4.44 \pm 0.87 ^a	2.41 \pm 0.12 ^b
C18:0	6.36 \pm 0.57 ^a	7.98 \pm 0.65 ^a	6.18 \pm 0.9 ^a	5.97 \pm 0.37 ^a
C22:0	0.53 \pm 0.16 ^a	0.57 \pm 0.04 ^a	0.45 \pm 0.07 ^a	0.71 \pm 0.13 ^a
C14:1	0.13 \pm 0.1 ^c	0.33 \pm 0.04 ^{bc}	0.89 \pm 0.27 ^b	4.13 \pm 0.31 ^a
C15:1	0.09 \pm 0.01 ^b	0.46 \pm 0.1 ^b	1.06 \pm 0.54 ^b	2.44 \pm 0.19 ^a
C16:1n-7	1.75 \pm 0.05 ^d	4.12 \pm 0.44 ^c	5.92 \pm 0.47 ^b	7.88 \pm 0.53 ^a
C18:1n-9	3.11 \pm 0.12 ^a	3.48 \pm 0.17 ^a	2.25 \pm 0.26 ^b	1.95 \pm 0.23 ^b
C18:1n-7	2.07 \pm 0.13 ^a	1.90 \pm 0.19 ^a	2.07 \pm 0.39 ^a	1.97 \pm 0.19 ^a
C20:1n-9	1.31 \pm 0.07 ^a	0.07 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.01 ^b	1.46 \pm 0.39 ^a
C22:1n-9	1.16 \pm 0.09 ^a	0.53 \pm 0.04 ^a	1.20 \pm 0.47 ^a	2.19 \pm 1.01 ^a
C18:2n-6	2.33 \pm 0.12 ^a	2.18 \pm 0.11 ^a	1.84 \pm 0.22 ^{ab}	1.45 \pm 0.12 ^b
C20:2n-6	1.73 \pm 0.29 ^a	2.84 \pm 0.16 ^a	2.70 \pm 0.53 ^a	2.10 \pm 0.18 ^a
C20:4n-6	4.17 \pm 0.14 ^a	4.37 \pm 0.36 ^a	3.21 \pm 0.6 ^a	3.82 \pm 0.22 ^a
C18:3n-3	1.43 \pm 0.04 ^a	1.03 \pm 0.16 ^a	1.18 \pm 0.25 ^a	0.82 \pm 0.07 ^a
C18:4n-3	0.19 \pm 0.03 ^v	0.95 \pm 0.13 ^a	0.35 \pm 0.07 ^{bc}	0.51 \pm 0.05 ^b
C20:4n-3	0.41 \pm 0.05 ^a	0.19 \pm 0.02 ^a	0.76 \pm 0.48 ^a	0.14 \pm 0.03 ^a
C20:5n-3	6.98 \pm 0.7 ^a	3.52 \pm 0.2 ^b	2.75 \pm 0.35 ^b	3.38 \pm 0.35 ^b
C22: 3n-3	1.77 \pm 0.1 ^a	0.18 \pm 0.03 ^a	2.97 \pm 1.42 ^a	1.94 \pm 0.85 ^a
C22:5n-3	1.21 \pm 0.1 ^a	0.79 \pm 0.03 ^a	2.93 \pm 1.92 ^a	2.77 \pm 1.11 ^a
C22:6n-3	22.93 \pm 0.9 ^a	14.25 \pm 0.56 ^b	14.47 \pm 0.92 ^b	10.45 \pm 0.83 ^c
C16:2n-4	0.75 \pm 0.38 ^a	0.47 \pm 0.13 ^a	2.70 \pm 1.74 ^a	1.29 \pm 0.19 ^a
C16:3n-4	0.19 \pm 0.03 ^d	3.45 \pm 0.21 ^a	2.49 \pm 0.45 ^b	1.03 \pm 0.13 ^c
C18:3n-4	0.06 \pm 0.01 ^a	0.75 \pm 0.25 ^a	0.35 \pm 0.16 ^a	0.92 \pm 0.54 ^a
C22:2i	0.73 \pm 0.18 ^b	0.04 \pm 0.007 ^b	0.15 \pm 0.04 ^b	1.37 \pm 0.54 ^a
C22:2j	0.13 \pm 0.11 ^a	0.81 \pm 0.33 ^a	0.15 \pm 0.04 ^a	1.45 \pm 0.75 ^a
AG (mg/100g)				
AGS	30.91 \pm 7.75 ^a	28.52 \pm 8.38 ^a	3.30 \pm 0.65 ^b	12.36 \pm 1.73 ^{ab}
AGMI	6.69 \pm 1.72 ^a	5.32 \pm 1.20 ^a	0.92 \pm 0.14 ^b	6.09 \pm 0.9 ^a
AGPI	32.10 \pm 9 ^a	18.60 \pm 5.04 ^{ab}	2.73 \pm 0.49 ^b	9.22 \pm 1.25 ^b
AGI	38.80 \pm 10.72 ^a	23.93 \pm 6.19 ^{ab}	3.66 \pm 0.63 ^b	15.32 \pm 1.9 ^b
n-3	25.03 \pm 7.11 ^a	11.25 \pm 3.38 ^b	1.74 \pm 0.29 ^b	5.40 \pm 0.69 ^b
n-6	5.97 \pm 1.65 ^a	4.66 \pm 1.09 ^{ab}	0.58 \pm 0.16 ^c	2.05 \pm 0.28 ^{bc}
EPA+DHA	21.43 \pm 6.09 ^a	9.43 \pm 2.75 ^b	1.26 \pm 0.29 ^b	3.71 \pm 0.34 ^b
n-3/n-6	4.19 ^a	2.41 ^b	3 ^b	2.63 ^b
AGPI/AGS	1.03 ^a	0.65 ^a	0.82 ^a	0.74 ^a
C16:0/C18:1n-9	10.82 ^a	11.48 ^a	14.82 ^a	14.92 ^a
AA/AL	1.80 ^a	2.05 ^a	1.90 ^a	2.68 ^a
C16:0/C18:0	5.49 ^a	5.17 ^a	4.91 ^a	4.67 ^a

Annexe (3). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PE chez *Pinctada radiata*(moyenne \pm SE; $n = 6$). a,b,c – valeurs dans les lignes ayant des indices de lettre différent de façon significative, $P \leq 0.05$.

%	Hiver	Printemps	Eté	Automne
C14:0	1.45 \pm 0.18 ^b	8.52 \pm 1.91 ^a	10.43 \pm 2.19 ^a	10.98 \pm 2.33 ^a
C15:0	0.44 \pm 0.02 ^b	1.56 \pm 0.09 ^b	1.25 \pm 0.12 ^b	3.88 \pm 0.77 ^a
C16:0	4.18 \pm 0.44 ^d	24.56 \pm 1.31 ^a	17.20 \pm 0.67 ^b	11.08 \pm 1.34 ^c
C17:0	1.14 \pm 0.07 ^b	1.12 \pm 0.12 ^b	1.17 \pm 0.12 ^b	1.83 \pm 0.27 ^a
C18:0	10.36 \pm 0.94 ^{ab}	12.03 \pm 0.69 ^a	8.37 \pm 0.62 ^b	5.50 \pm 1 ^c
C22:0	0.24 \pm 0.03 ^b	0.38 \pm 0.27 ^b	2.11 \pm 0.35 ^a	2.29 \pm 0.65 ^a
C14:1	0.43 \pm 0.03 ^b	1.40 \pm 0.1 ^b	1.81 \pm 0.19 ^b	6.12 \pm 1.43 ^a
C15:1	0.12 \pm 0.004 ^b	2.79 \pm 0.71 ^a	3.08 \pm 0.76 ^a	3.62 \pm 1.13 ^a
C16:1n-7	4.19 \pm 0.43 ^b	13.59 \pm 1 ^a	9.79 \pm 0.8 ^a	10.15 \pm 2.15 ^a
C18:1n-9	0.89 \pm 0.08 ^d	3.39 \pm 0.33 ^b	4.59 \pm 0.39 ^a	2.08 \pm 0.38 ^c
C18:1n-7	0.45 \pm 0.03 ^b	1.01 \pm 0.18 ^a	1.01 \pm 0.09 ^a	0.83 \pm 0.11 ^a
C20:1n-9	0.08 \pm 0.01 ^b	0.38 \pm 0.07 ^b	0.25 \pm 0.01 ^b	3.12 \pm 1.18 ^a
C22:1n-9	8.72 \pm 0.86 ^a	2.06 \pm 0.42 ^b	1.17 \pm 0.19 ^b	1.46 \pm 0.47 ^b
C18:2n-6	1.21 \pm 0.13 ^{ab}	1.25 \pm 0.28 ^{ab}	1.83 \pm 0.15 ^a	0.82 \pm 0.23 ^b
C20:2n-6	1.76 \pm 0.08 ^a	1.11 \pm 0.81 ^a	3.30 \pm 1.48 ^a	0.65 \pm 0.56 ^a
C20:4n-6	8.00 \pm 0.33 ^a	0.26 \pm 0.07 ^b	1.43 \pm 0.35 ^b	1.46 \pm 0.69 ^b
C18:3n-3	2.40 \pm 0.37 ^{ab}	1.06 \pm 0.39 ^b	2.73 \pm 0.49 ^a	1.69 \pm 0.4 ^{ab}
C18:4n-3	0.09 \pm 0.01 ^a	0.60 \pm 0.5 ^a	0.41 \pm 0.1 ^a	1.00 \pm 0.6 ^a
C20:4n-3	0.33 \pm 0.04 ^b	0.26 \pm 0.12 ^b	0.52 \pm 0.09 ^b	2.60 \pm 1.03 ^a
C20:5n-3	12.37 \pm 0.94 ^a	1.83 \pm 0.49 ^b	1.50 \pm 0.37 ^b	2.25 \pm 0.68 ^b
C22:3n-3	trace	Trace	trace	trace
C22:5n-3	2.92 \pm 0.15 ^b	1.88 \pm 0.52 ^b	2.02 \pm 0.33 ^b	6.21 \pm 1.95 ^a
C22:6n-3	33.63 \pm 0.39 ^a	8.45 \pm 1.23 ^b	6.52 \pm 0.55 ^b	9.97 \pm 1.6 ^b
C16:2n-4	0.66 \pm 0.04 ^b	3.83 \pm 1.41 ^b	13.36 \pm 2.17 ^a	0.99 \pm 0.17 ^b
C16:3n-4	0.36 \pm 0.03 ^a	0.94 \pm 0.26 ^a	0.62 \pm 0.26 ^a	0.43 \pm 0.11 ^a
C18:3n-4	0.13 \pm 0.02 ^a	4.09 \pm 1.28 ^a	0.92 \pm 0.25 ^a	4.08 \pm 2.34 ^a
C22:2i	1.20 \pm 0.68 ^a	1.00 \pm 0.45 ^a	1.76 \pm 0.35 ^a	3.44 \pm 1.62 ^a
C22:2j	2.12 \pm 0.66 ^a	0.53 \pm 0.12 ^a	0.71 \pm 0.21 ^a	1.35 \pm 0.5 ^a
AG (mg/100g)				
AGS	5.64 \pm 1.57 ^a	2.54 \pm 0.86 ^{ab}	0.69 \pm 0.14 ^b	5.7 \pm 1.52 ^a
AGMI	4.84 \pm 1.21 ^a	1.22 \pm 0.34 ^b	0.36 \pm 0.08 ^b	4.22 \pm 0.95 ^b
AGPI	22.25 \pm 6 ^a	1.27 \pm 0.3 ^b	0.62 \pm 0.1 ^b	5.98 \pm 1.27 ^b
AGI	27.10 \pm 7.08 ^a	2.49 \pm 0.63 ^b	0.99 \pm 0.18 ^b	10.21 \pm 1.82 ^b
n-3	17.17 \pm 4.74 ^a	0.7 \pm 0.21 ^b	0.23 \pm 0.04 ^b	3.75 \pm 0.7 ^b
n-6	3.61 \pm 0.91 ^a	0.12 \pm 0.04 ^b	0.1 \pm 0.02 ^b	0.48 \pm 0.2 ^b
EPA+DHA	15.29 \pm 4.31 ^a	0.52 \pm 0.16 ^b	0.13 \pm 0.03 ^b	1.81 \pm 0.3 ^b
n-3/n-6	4.75 ^b	5.83 ^b	2.3 ^b	7.81 ^a
AGPI/AGS	3.93 ^a	0.50 ^b	0.89 ^b	1.05 ^b
C16:0/C18:1n-9	4.92 ^b	7.44 ^a	3.86 ^b	5.72 ^b
AA/AL	6.86 ^a	0.80 ^b	0.91 ^b	2.34 ^b
C16:0/C18:0	0.40 ^a	2.05 ^a	2.10 ^a	2.18 ^a

Annexe (4). Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides totaux de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm ES; $n = 6$).

%	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	2,66 \pm 0.42	2,9 \pm 0,69	3,08 \pm 0,34	3,03 \pm 0,33
C15:0	1,69 \pm 0.40	0,98 \pm 0,18	1,3 \pm 0,03	1,41 \pm 0,18
C16:0	25,69 \pm 1.62	20,11 \pm 4,06	27,38 \pm 1,82	32,93 \pm 2,15
C17:0	1,01 \pm 0.09	0,50 \pm 0,09	4,08 \pm 2,11	1,29 \pm 0,63
C18:0	34,02 \pm 5.22	8,79 \pm 1,89	20,24 \pm 2,12	18,89 \pm 2,13
C22:0	1,43 \pm 0.50	0,91 \pm 0,16	1,81 \pm 0,88	0,50 \pm 0,13
C14:1	0,46 \pm 0.09	1,00 \pm 0,27	1,46 \pm 0,08	0,42 \pm 0,11
C15:1	1,84 \pm 0.28	29,78 \pm 10,86	1,65 \pm 0,21	0,43 \pm 0,06
C16:1	2,02 \pm 0.70	2,96 \pm 0,54	2,61 \pm 0,55	2,54 \pm 0,59
C18:1	5,12 \pm 1.93	8,14 \pm 1,53	5,60 \pm 0,58	4,74 \pm 0,76
C20:1	0,63 \pm 0.31	0,24 \pm 0,05	0,70 \pm 0,52	0,39 \pm 0,09
C18:2n-6	1,65 \pm 0.58	1,47 \pm 0,21	1,32 \pm 0,21	0,93 \pm 0,29
C20:2n-6	0,70 \pm 0.56	0,31 \pm 0,17	3,34 \pm 2,06	0,91 \pm 0,54
C20:4n-6	0,11 \pm 0.05	0,42 \pm 0,23	0,25 \pm 0,06	0,11 \pm 0,04
C18:3n-3	0,12 \pm 0.03	1,20 \pm 0,27	2,96 \pm 0,25	1,80 \pm 0,52
C18:4n-3	0,50 \pm 0.19	0,19 \pm 0,11	0,74 \pm 0,13	0,18 \pm 0,13
C20:4n-3	0,23 \pm 0.05	0,76 \pm 0,36	0,89 \pm 0,16	1,02 \pm 0,17
C20:5n-3	0,60 \pm 0.18	1,00 \pm 0,29	0,92 \pm 0,16	1,45 \pm 0,18
C22:5n-3	1,44 \pm 0.47	2,44 \pm 0,48	7,04 \pm 3,57	11,19 \pm 4,11
C22:6n-3	6,94 \pm 2.91	13,13 \pm 3,42	5,51 \pm 0,62	11,58 \pm 2,73
C16:2n-4	3,55 \pm 0.47	0,86 \pm 0,15	3,03 \pm 1,06	1,22 \pm 0,22
C16:3n-4	1,00 \pm 0.25	0,56 \pm 0,13	1,01 \pm 0,18	1,20 \pm 0,22
C18:3n-4	5,91 \pm 1.77	0,18 \pm 0,04	0,85 \pm 0,25	0,54 \pm 0,17
C22:2i	0,29 \pm 0.07	0,61 \pm 0,1	1,47 \pm 0,52	0,87 \pm 0,28
C22:2j	0,26 \pm 0.13	0,45 \pm 0,15	0,65 \pm 0,08	0,29 \pm 0,11
AGS	66,53 \pm 6.36	34,21 \pm 6,73	57,92 \pm 3,59	58,07 \pm 4,33
AGMI	10,08 \pm 2.81	42,14 \pm 8,85	12,04 \pm 1,62	8,54 \pm 1,34
AGPI	23,37 \pm 4.66	23,64 \pm 4,09	30,03 \pm 3,52	33,38 \pm 5,38
AGU	33,46 \pm 6.36	65,78 \pm 6,73	42,07 \pm 3,59	41,92 \pm 4,33
n-3	9,86 \pm 2.85	18,75 \pm 3,92	18,08 \pm 3,75	27,25 \pm 6,28
n-6	2,48 \pm 0.78	2,20 \pm 0,56	4,91 \pm 2,2	1,97 \pm 0,64
EPA+DHA	7,55 \pm 2.88	14,13 \pm 3,46	6,43 \pm 0,69	13,03 \pm 2,79

Annexe (5). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PC de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	3,80 \pm 0,3	8,44 \pm 0,85	8,87 \pm 0,81	4,73 \pm 1
C15:0	1,97 \pm 0,27	1,53 \pm 0,13	2,71 \pm 0,11	2,67 \pm 0,65
C16:0	14,84 \pm 1,53	19,93 \pm 1,7	24,17 \pm 1,96	9,96 \pm 1,29
C17:0	2,88 \pm 0,46	7,01 \pm 0,82	11,33 \pm 1,79	3,83 \pm 0,29
C18:0	14,71 \pm 0,71	15,19 \pm 2,14	9,78 \pm 1,18	4,61 \pm 0,74
C22:0	1,56 \pm 0,28	1,31 \pm 0,53	0,52 \pm 0,16	8,76 \pm 1,35
C14:1	1,71 \pm 0,23	1,26 \pm 0,32	1,63 \pm 0,57	1,82 \pm 1,02
C15:1	4,39 \pm 1	2,95 \pm 0,33	3,06 \pm 0,5	1,66 \pm 0,36
C16:1	4,35 \pm 0,48	3,17 \pm 0,28	4,68 \pm 0,62	2,20 \pm 0,39
C18:1n-9	4,11 \pm 0,85	2,35 \pm 0,51	5,92 \pm 0,94	1,26 \pm 0,15
C18:1n-7	1,46 \pm 0,29	0,57 \pm 0,03	0,85 \pm 0,21	0,31 \pm 0,07
C20:1n-9	0,23 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03	0,30 \pm 0,07	1,11 \pm 0,36
C22:1	5,13 \pm 0,52	5,01 \pm 2,94	1,98 \pm 0,64	3,79 \pm 2,02
C18:2n-6	2,60 \pm 0,26	1,94 \pm 1,06	2,92 \pm 0,81	0,49 \pm 0,09
C20:2n-6	2,69 \pm 0,89	0,68 \pm 0,11	0,56 \pm 0,23	1,10 \pm 0,61
C20:4n-6	1,10 \pm 0,3	0,29 \pm 0,05	0,23 \pm 0,02	0,96 \pm 0,49
C18:3n-3	3,93 \pm 0,76	4,49 \pm 0,18	3,36 \pm 0,51	1,24 \pm 0,2
C18:4n-3	0,83 \pm 0,22	0,67 \pm 0,09	0,79 \pm 0,18	0,93 \pm 0,29
C20:4n-3	0,88 \pm 0,21	0,52 \pm 0,08	0,81 \pm 0,08	1 \pm 0,53
C20:5n-3	9,26 \pm 1,11	1,03 \pm 0,16	0,98 \pm 0,35	0,86 \pm 0,49
C22:3n-3	3,30 \pm 0,52	3,14 \pm 0,67	2,34 \pm 0,57	11,21 \pm 5,38
C22:5n-3	1,95 \pm 0,41	4,46 \pm 1,42	2,39 \pm 0,34	17,40 \pm 4,09
C22:6n-3	3,86 \pm 0,44	6,92 \pm 1,34	3,95 \pm 0,32	9,51 \pm 2,75
C16:2n-4	3,63 \pm 0,84	2,54 \pm 0,47	2,27 \pm 0,56	1,43 \pm 0,46
C16:3n-4	1,41 \pm 0,48	0,44 \pm 0,07	0,82 \pm 0,12	1,41 \pm 0,61
C18:3n-4	0,71 \pm 0,36	1,09 \pm 0,34	0,98 \pm 0,13	0,33 \pm 0,16
C22:2i	1,61 \pm 0,61	1,18 \pm 0,34	0,85 \pm 0,36	1,77 \pm 0,19
C22:2j	0,97 \pm 0,15	1,56 \pm 1,15	0,79 \pm 0,18	3,50 \pm 1,6
AGS	39,79 \pm 1,69	53,43 \pm 3,66	57,41 \pm 2,54	34,59 \pm 2,86
AGMI	21,40 \pm 2,16	15,55 \pm 2,31	18,46 \pm 1,25	12,19 \pm 2,15
AGPI	38,80 \pm 2,92	31,01 \pm 2,21	24,12 \pm 1,9	53,21 \pm 3,15
AGU	60,20 \pm 1,69	46,56 \pm 3,66	42,58 \pm 2,54	65,40 \pm 2,86
n-3	24,03 \pm 2,19	16,76 \pm 2,49	14,66 \pm 1,14	42,18 \pm 3,94
n-6	6,40 \pm 1,15	2,92 \pm 1,01	3,72 \pm 0,76	2,56 \pm 0,91
EPA+DHA	13,12 \pm 1,1	7,95 \pm 1,49	4,93 \pm 0,54	10,37 \pm 3,21

Annexe (6). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PE de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	3,12 \pm 0,24	6,28 \pm 0,61	6,49 \pm 0,59	5,16 \pm 1,07
C15:0	4,03 \pm 0,84	1,66 \pm 0,26	4,93 \pm 0,64	2,86 \pm 0,67
C16:0	10,74 \pm 0,63	20,80 \pm 1,84	25,36 \pm 0,82	19,0 \pm 2,64
C17:0	2,18 \pm 0,43	0,95 \pm 0,27	1,73 \pm 0,62	2,46 \pm 0,2
C18:0	8,32 \pm 0,56	13,49 \pm 1,27	10,02 \pm 0,49	7,55 \pm 0,85
C22:0	2,22 \pm 0,39	0,99 \pm 0,36	0,70 \pm 0,08	1,61 \pm 0,43
C14:1	2,22 \pm 0,27	1,48 \pm 0,41	1,61 \pm 0,59	1,60 \pm 0,39
C15:1	2,15 \pm 0,37	2,76 \pm 0,3	2,75 \pm 0,44	1,64 \pm 0,25
C16:1	4,01 \pm 0,19	4,95 \pm 0,54	7,79 \pm 0,58	5,06 \pm 0,7
C18:1n-9	3,90 \pm 0,31	4,96 \pm 1,16	2,78 \pm 1,05	3,03 \pm 0,35
C18:1n-7	0,85 \pm 0,16	0,80 \pm 0,08	3,03 \pm 1,35	0,71 \pm 0,08
C20:1n-9	3,56 \pm 0,75	0,27 \pm 0,07	0,24 \pm 0,08	2,34 \pm 1,04
C22:1	6,98 \pm 1,3	0,93 \pm 0,21	1,15 \pm 0,19	7,68 \pm 2,05
C18:2n-6	2,78 \pm 0,4	1,46 \pm 0,34	4,22 \pm 0,87	0,76 \pm 0,2
C20:2n-6	8,71 \pm 2,42	0,62 \pm 0,26	0,21 \pm 0,07	0,10 \pm 0,05
C20:4n-6	0,49 \pm 0,16	0,44 \pm 0,13	0,32 \pm 0,06	2,12 \pm 0,64
C18:3n-3	1,44 \pm 0,63	3,99 \pm 0,29	2,57 \pm 0,33	2,34 \pm 0,54
C18:4n-3	0,08 \pm 0,06	0,46 \pm 0,04	0,39 \pm 0,09	0,82 \pm 0,22
C20:4n-3	1,20 \pm 0,24	3,33 \pm 2,73	0,63 \pm 0,14	0,94 \pm 0,62
C20:5n-3	8,00 \pm 1,09	0,91 \pm 0,32	1,19 \pm 0,33	1,04 \pm 0,45
C22:5n-3	3,31 \pm 0,55	8,46 \pm 4,03	3,45 \pm 1,02	4,77 \pm 0,84
C22:6n-3	6,35 \pm 1,18	7,64 \pm 2,31	4,52 \pm 0,36	17,01 \pm 2,52
C16:2n-4	5,27 \pm 0,16	6,43 \pm 0,58	10,14 \pm 1,13	6,01 \pm 0,83
C16:3n-4	3,73 \pm 0,12	1,27 \pm 0,35	0,83 \pm 0,23	0,16 \pm 0,02
C18:3n-4	0,38 \pm 0,17	2,68 \pm 1,99	1,11 \pm 0,38	0,63 \pm 0,29
C22:2i	2,20 \pm 0,48	1,01 \pm 0,43	0,88 \pm 0,21	1,27 \pm 0,26
C22:2j	1,65 \pm 0,83	0,84 \pm 0,33	0,83 \pm 0,3	1,16 \pm 0,43
AGS	30,63 \pm 1,69	44,19 \pm 3,55	49,25 \pm 0,66	38,67 \pm 3,45
AGMI	23,68 \pm 2,03	16,19 \pm 1,75	19,37 \pm 1,24	22,10 \pm 2,02
AGPI	45,67 \pm 2,34	39,60 \pm 5,18	31,37 \pm 1,58	39,22 \pm 2,5
AGU	69,36 \pm 1,69	55,80 \pm 3,55	50,74 \pm 0,66	61,32 \pm 3,45
n-3	20,41 \pm 2,71	24,81 \pm 6,56	12,78 \pm 1,23	26,95 \pm 2,76
n-6	11,99 \pm 2,58	2,53 \pm 0,31	4,76 \pm 0,9	3,0 \pm 0,58
EPA+DHA	14,36 \pm 1,78	8,56 \pm 2,21	5,71 \pm 0,59	18,06 \pm 2,73

Annexe (7). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PI de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	3,98 \pm 0,43	5,43 \pm 0,3	6,3 \pm 0,54	3,12 \pm 0,64
C15:0	1,95 \pm 0,08	1,59 \pm 0,12	2,72 \pm 0,52	1,83 \pm 0,38
C16:0	13,80 \pm 1,55	25,54 \pm 1,07	23,20 \pm 0,55	14,34 \pm 2,31
C17:0	2,05 \pm 0,44	0,50 \pm 0,1	1,15 \pm 0,31	1,74 \pm 0,28
C18:0	12,07 \pm 1,35	18,21 \pm 0,87	9,88 \pm 0,77	6,85 \pm 1,23
C22:0	0,55 \pm 0,08	1,31 \pm 0,5	0,53 \pm 0,18	4,75 \pm 1,65
C14:1	2,23 \pm 0,27	0,94 \pm 0,12	3,34 \pm 0,59	0,92 \pm 0,14
C15:1	3,25 \pm 0,7	2,53 \pm 0,24	1,20 \pm 0,19	2,42 \pm 0,18
C16:1	4,23 \pm 0,59	4,26 \pm 0,35	5,10 \pm 1,58	3,80 \pm 0,74
C18:1n-9	4,99 \pm 0,67	4,77 \pm 0,46	6,51 \pm 2,18	2,03 \pm 0,32
C18:1n-7	1,48 \pm 0,15	0,73 \pm 0,11	3,05 \pm 1,18	0,71 \pm 0,16
C20:1n-9	3,19 \pm 1,32	0,28 \pm 0,04	0,19 \pm 0,05	0,92 \pm 0,17
C22:1	2,62 \pm 1,01	2,34 \pm 0,58	1,61 \pm 0,36	13,48 \pm 2,49
C18:2n-6	3,40 \pm 0,42	1,62 \pm 0,55	3,82 \pm 1,01	0,19 \pm 0,04
C20:2n-6	0,49 \pm 0,14	0,13 \pm 0,05	0,2 \pm 0,1	1,21 \pm 1,18
C20:4n-6	0,30 \pm 0,10	0,54 \pm 0,25	0,20 \pm 0,04	1,61 \pm 0,49
C18:3n-3	0,54 \pm 0,17	5,71 \pm 0,19	3,77 \pm 0,29	2,28 \pm 0,49
C18:4 n-3	1,50 \pm 1,25	0,67 \pm 0,13	0,88 \pm 0,15	0,92 \pm 0,22
C20:4n-3	0,90 \pm 0,12	0,75 \pm 0,44	0,45 \pm 0,08	2,08 \pm 0,52
C20:5n-3	12,56 \pm 1,57	1,04 \pm 0,23	1,91 \pm 0,76	3,73 \pm 1,42
C22:5n-3	1,45 \pm 0,43	3,03 \pm 0,74	2,30 \pm 0,17	10,13 \pm 1,03
C22:6n-3	12,64 \pm 9,82	6,08 \pm 0,85	4,93 \pm 0,48	11,87 \pm 0,83
C16:2n-4	5,00 \pm 0,74	7,94 \pm 0,19	13,55 \pm 1,88	4,94 \pm 0,88
C16:3n-4	1,44 \pm 0,62	1,20 \pm 0,28	0,89 \pm 0,2	0,62 \pm 0,45
C18:3n-4	1,17 \pm 0,32	0,87 \pm 0,18	1,05 \pm 0,19	0,37 \pm 0,04
C22:2i	0,86 \pm 0,15	0,65 \pm 0,18	0,84 \pm 0,2	2,23 \pm 1,03
C22:2j	1,22 \pm 0,4	1,20 \pm 0,5	0,29 \pm 0,06	0,8 \pm 0,29
AGS	34,42 \pm 3,58	52,61 \pm 1,36	43,81 \pm 1,44	32,65 \pm 2,66
AGMI	22,02 \pm 2,82	15,88 \pm 1,01	21,04 \pm 2,69	24,30 \pm 1,7
AGPI	43,55 \pm 6,04	31,50 \pm 2,19	35,13 \pm 2,18	43,03 \pm 2,18
AGU	65,57 \pm 3,58	47,38 \pm 1,36	56,18 \pm 1,44	67,34 \pm 2,66
n-3	29,61 \pm 8	17,31 \pm 2,08	14,26 \pm 1,03	31,03 \pm 1,70
n-6	4,21 \pm 0,56	2,30 \pm 0,59	4,22 \pm 0,98	3,02 \pm 1,43
EPA+DHA	25,20 \pm 8,52	7,13 \pm 0,94	6,84 \pm 0,92	15,6 \pm 1,97

Annexe (8). Variations saisonnières de la composition en acides gras des PS de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

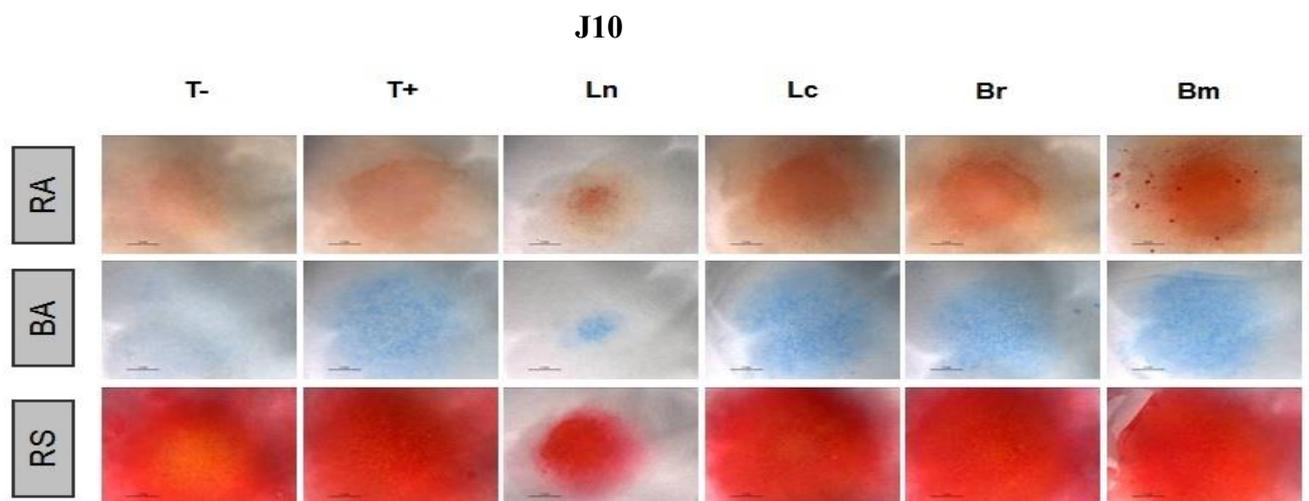
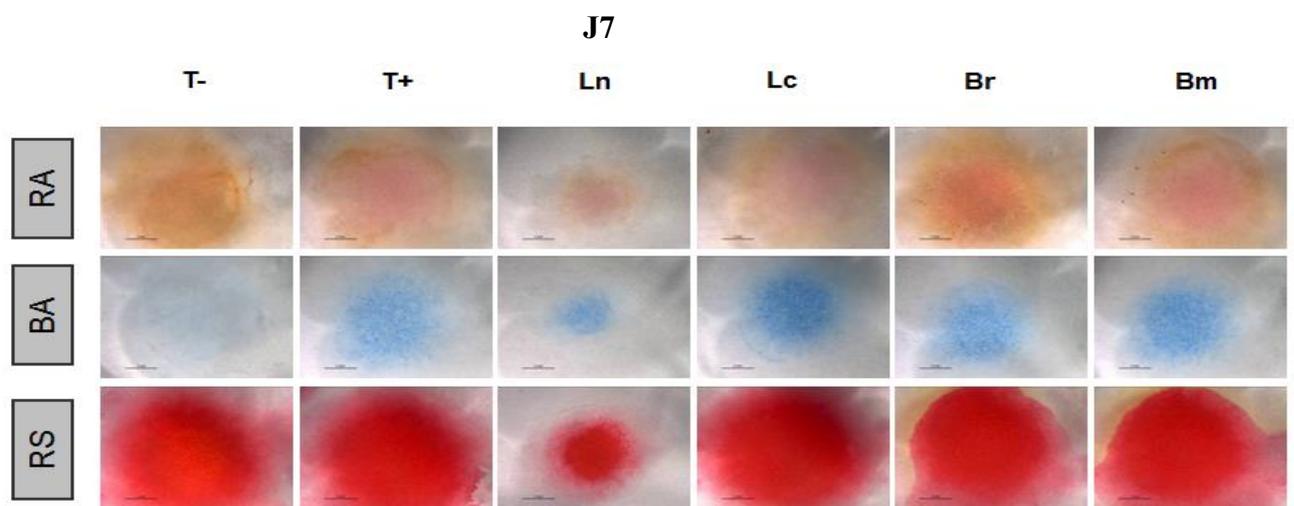
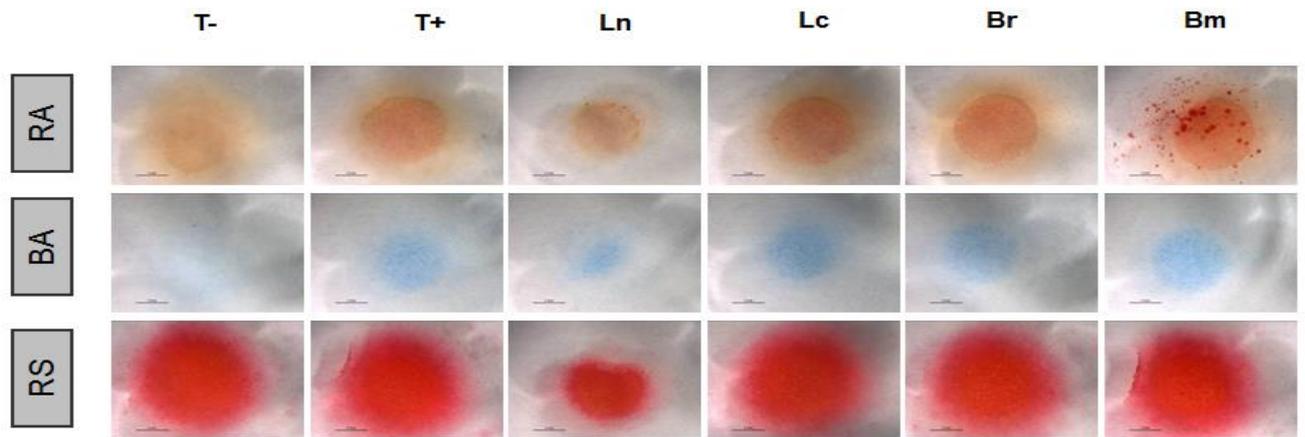
(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	3,53 \pm 0,3	3,43 \pm 0,76	3,41 \pm 0,28	4,04 \pm 1,32
C15:0	2,84 \pm 0,65	1,03 \pm 0,23	0,81 \pm 0,05	2,63 \pm 0,81
C16:0	14,58 \pm 1,84	17,95 \pm 2,98	27,38 \pm 1,18	13,23 \pm 1,16
C17:0	1,33 \pm 0,27	0,89 \pm 0,17	1,52 \pm 0,08	2,28 \pm 0,8
C18:0	16,77 \pm 1,89	12,15 \pm 2,16	14,02 \pm 1,32	5,57 \pm 0,41
C22:0	1,65 \pm 0,92	0,64 \pm 0,2	0,87 \pm 0,28	7,32 \pm 2,19
C14:1	2,12 \pm 0,36	0,44 \pm 0,07	1,99 \pm 0,1	1,01 \pm 0,34
C15:1	2,59 \pm 0,5	1,63 \pm 0,4	1,77 \pm 0,27	1,96 \pm 0,65
C16:1	3,43 \pm 0,4	2,79 \pm 0,58	4,62 \pm 0,28	3,04 \pm 0,34
C18:1n-9	4,31 \pm 0,86	3,25 \pm 0,55	7,85 \pm 2,49	1,77 \pm 0,06
C18:1n-7	1,34 \pm 0,18	0,43 \pm 0,07	2,5 \pm 1,52	0,51 \pm 0,11
C20:1n-9	2,45 \pm 1,14	0,23 \pm 0,06	0,34 \pm 0,08	0,59 \pm 0,25
C22:1	6,46 \pm 2,33	3,90 \pm 1,56	1,15 \pm 0,19	5,73 \pm 3
C18:2n-6	2,81 \pm 0,45	0,97 \pm 0,15	4,76 \pm 0,43	0,74 \pm 0,08
C20:2n-6	1,00 \pm 0,47	0,30 \pm 0,11	0,19 \pm 0,04	3,63 \pm 2,22
C20:4n-6	0,65 \pm 0,25	0,33 \pm 0,08	0,63 \pm 0,17	0,42 \pm 0,12
C18:3n-3	2,48 \pm 1,17	3,89 \pm 0,64	3,65 \pm 0,28	1,52 \pm 0,52
C18:4n-3	1,15 \pm 0,71	0,33 \pm 0,07	0,93 \pm 0,36	0,57 \pm 0,32
C20:4n-3	1,20 \pm 0,26	0,39 \pm 0,13	0,65 \pm 0,23	1,08 \pm 0,68
C20:5n-3	10,94 \pm 0,94	0,88 \pm 0,18	0,75 \pm 0,22	1,34 \pm 0,57
C22:5n-3	2,38 \pm 0,31	19,47 \pm 7,2	1,78 \pm 0,49	21,60 \pm 2,43
C22:6n-3	6,51 \pm 2,6	13,66 \pm 3,78	4,33 \pm 0,59	11,42 \pm 2,94
C16:2n-4	3,02 \pm 0,47	5,07 \pm 0,95	10,44 \pm 1,36	1,35 \pm 0,74
C16:3n-4	0,51 \pm 0,15	0,52 \pm 0,13	1,23 \pm 0,21	0,76 \pm 0,38
C18:3n-4	0,78 \pm 0,23	1,64 \pm 1,03	0,43 \pm 0,19	0,64 \pm 0,22
C22:2i	1,42 \pm 0,58	1,38 \pm 0,47	1,03 \pm 0,49	2,90 \pm 1,06
C22:2j	1,64 \pm 0,37	2,28 \pm 0,71	0,81 \pm 0,15	2,21 \pm 0,66
AGS	40,73 \pm 2,75	36,12 \pm 6,31	48,03 \pm 2,09	35,10 \pm 4,1
AGMI	22,73 \pm 2,25	12,69 \pm 2,18	20,26 \pm 2,19	14,64 \pm 2,91
AGPI	36,52 \pm 2,7	51,17 \pm 8,03	31,69 \pm 0,85	50,25 \pm 3,47
AGU	59,26 \pm 2,75	63,87 \pm 6,31	51,96 \pm 2,09	64,89 \pm 4,10
n-3	24,68 \pm 2,63	38,64 \pm 9,76	12,13 \pm 1,55	37,55 \pm 3,22
n-6	4,46 \pm 0,7	1,61 \pm 0,3	5,58 \pm 0,34	4,80 \pm 2,2
EPA+DHA	17,45 \pm 2,02	14,54 \pm 3,71	5,09 \pm 0,79	12,76 \pm 2,99

Annexe (9). Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la chair de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	2,60 \pm 0.20	3,84 \pm 0,64	5,23 \pm 0,77	3,35 \pm 0,38
C15:0	0,93 \pm 0.17	27,27 \pm 6,37	1,03 \pm 0,21	0,3 \pm 0,04
C16:0	18,98 \pm 1.05	20,48 \pm 2,01	30,74 \pm 1,18	25,57 \pm 2,29
C17:0	0,21 \pm 0.07	1,60 \pm 0,16	1,41 \pm 0,17	0,99 \pm 0,11
C18:0	23,53 \pm 4.26	8,7 \pm 0,88	21,0 \pm 2,87	17,42 \pm 2,41
C22:0	2,29 \pm 0.24	2,76 \pm 0,38	1,56 \pm 0,26	4,76 \pm 1,2
C14:1	0,32 \pm 0.06	2,21 \pm 0,46	0,94 \pm 0,17	1,22 \pm 0,19
C15:1	0,27 \pm 0.05	1,0 \pm 0,14	1,10 \pm 0,28	0,56 \pm 0,08
C16:1	1,95 \pm 0.15	2,41 \pm 0,21	3,56 \pm 0,44	1,78 \pm 0,15
C18:1	3,06 \pm 0.36	1,89 \pm 0,18	1,55 \pm 0,26	1,84 \pm 0,26
C20:1	1,01 \pm 0.25	0,13 \pm 0,03	0,15 \pm 0,04	0,31 \pm 0,06
C18:2n-6	1,76 \pm 0.15	1,20 \pm 0,13	1,42 \pm 0,63	1,10 \pm 0,11
C20:2n-6	0,27 \pm 0.05	0,22 \pm 0,03	0,69 \pm 0,26	0,65 \pm 0,34
C20:4n-6	5,61 \pm 0.69	3,69 \pm 0,52	3,19 \pm 0,92	2,04 \pm 0,63
C18:3n-3	0,47 \pm 0.05	0,69 \pm 0,2	3,52 \pm 0,58	1,20 \pm 0,21
C18:4n-3	0,66 \pm 0.10	0,63 \pm 0,17	0,67 \pm 0,33	0,84 \pm 0,26
C20:4n-3	0,35 \pm 0.05	0,17 \pm 0,04	0,33 \pm 0,05	1,38 \pm 0,59
C20:5n-3	8,12 \pm 1.36	3,17 \pm 0,35	2,60 \pm 0,49	3,21 \pm 0,57
C22:5n-3	1,24 \pm 0.14	1,05 \pm 0,16	2,38 \pm 0,93	5,23 \pm 0,89
C22:6n-3	21,60 \pm 2.58	12,26 \pm 1,22	10,69 \pm 1,2	13,62 \pm 1,20
C16:2n-4	1,41 \pm 0.05	1,42 \pm 0,18	3,22 \pm 0,67	4,72 \pm 0,39
C16:3n-4	0,62 \pm 0.08	0,33 \pm 0,03	0,89 \pm 0,2	0,51 \pm 0,05
C18:3n-4	1,27 \pm 0.36	1,8 \pm 0,74	0,78 \pm 0,15	0,70 \pm 0,23
C22:2i	0,20 \pm 0.13	0,87 \pm 0,14	0,98 \pm 0,17	5,82 \pm 1,67
C22:2j	1,12 \pm 0.21	0,08 \pm 0,02	0,26 \pm 0,08	0,75 \pm 0,22
AGS	48,57 \pm 4.54	64,67 \pm 3,06	60,99 \pm 2,13	52,42 \pm 3,36
AGMI	6,64 \pm 0.55	7,66 \pm 0,83	7,32 \pm 1,01	5,71 \pm 0,55
AGPI	44,77 \pm 4.51	27,65 \pm 2,55	31,68 \pm 1,68	41,85 \pm 3,59
AGU	51,42 \pm 4.54	35,32 \pm 3,06	39,0 \pm 2,13	47,57 \pm 3,36
n-3	32,46 \pm 3.21	18,00 \pm 1,59	20,22 \pm 1,71	25,51 \pm 2,77
n-6	7,65 \pm 0.76	5,13 \pm 0,61	5,30 \pm 0,69	3,81 \pm 0,92
n-3/n-6	4,22 \pm 0.27	3,57 \pm 0,14	3,99 \pm 0,43	9,51 \pm 3
EPA+DHA	29,72 \pm 3.57	15,44 \pm 1,46	13,30 \pm 1,67	16,83 \pm 1,39

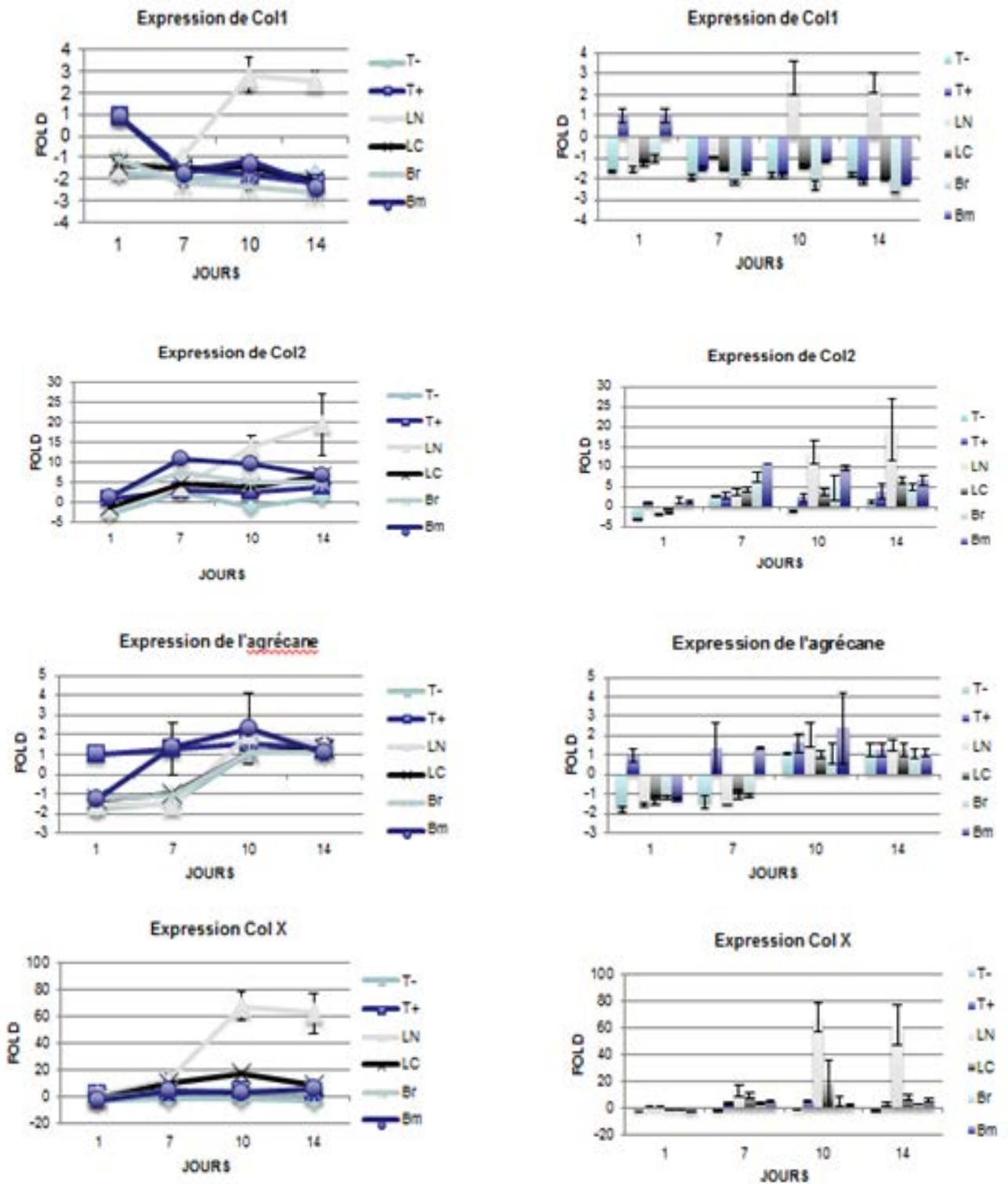
Annexe (10). Variations saisonnières de la composition en acides gras des lipides polaires de la nacre de *Pinctada radiata* (moyenne \pm SE; $n = 6$).

(%)	hiver	printemps	été	Automne
C14:0	3,33 \pm 0,28	2,69 \pm 0,39	3,67 \pm 0,35	3,29 \pm 0,37
C15:0	1,42 \pm 0,19	1,94 \pm 0,25	1,61 \pm 0,24	1,72 \pm 0,10
C16:0	22,92 \pm 1,22	30,75 \pm 2,69	37,82 \pm 2,21	34,20 \pm 1,66
C17:0	0,80 \pm 0,18	0,80 \pm 0,13	0,33 \pm 0,06	0,66 \pm 0,1
C18:0	31,30 \pm 2,89	35,23 \pm 1,19	26,80 \pm 1,5	19,43 \pm 1,46
C22:0	0,14 \pm 0,03	0,78 \pm 0,14	0,43 \pm 0,1	1,15 \pm 0,21
C14:1	1,02 \pm 0,15	0,60 \pm 0,13	0,72 \pm 0,24	0,45 \pm 0,16
C15:1	1,39 \pm 0,40	0,64 \pm 0,09	2,56 \pm 0,24	0,73 \pm 0,07
C16:1	2,85 \pm 0,22	1,37 \pm 0,19	2,44 \pm 0,35	3,17 \pm 0,54
C18:1	7,67 \pm 0,90	3,51 \pm 0,91	4,72 \pm 0,45	5,1 \pm 0,66
C20:1	0,55 \pm 0,20	0,36 \pm 0,05	0,22 \pm 0,07	0,41 \pm 0,1
C18:2n-6	5,49 \pm 0,79	0,48 \pm 0,07	1,32 \pm 0,47	1,52 \pm 0,19
C20:2n-6	1,17 \pm 0,14	0,39 \pm 0,18	0,62 \pm 0,29	1,17 \pm 0,46
C20:4n-6	0,38 \pm 0,06	0,13 \pm 0,05	0,14 \pm 0,03	0,18 \pm 0,05
C18:3n-3	0,63 \pm 0,43	1,50 \pm 0,25	1,32 \pm 0,27	2,06 \pm 0,31
C18:4n-3	0,94 \pm 0,48	0,44 \pm 0,29	0,26 \pm 0,15	0,34 \pm 0,12
C20:4n-3	0,47 \pm 0,09	0,52 \pm 0,17	0,34 \pm 0,04	0,58 \pm 0,02
C20:5n-3	4,20 \pm 1,28	0,76 \pm 0,17	0,45 \pm 0,07	0,63 \pm 0,1
C22:5n-3	0,47 \pm 0,06	4,59 \pm 2,25	4,43 \pm 2,92	4,47 \pm 0,66
C22:6n-3	2,12 \pm 0,45	6,87 \pm 2,03	2,86 \pm 0,24	6,35 \pm 0,26
C16:2n-4	1,20 \pm 0,10	3,38 \pm 0,34	4,16 \pm 0,49	7,24 \pm 0,69
C16:3n-4	0,58 \pm 0,08	0,71 \pm 0,12	0,82 \pm 0,11	1,19 \pm 0,19
C18:3n-4	7,98 \pm 5,30	0,38 \pm 0,09	0,79 \pm 0,18	1,09 \pm 0,15
C22:2i	0,26 \pm 0,03	0,48 \pm 0,12	0,75 \pm 0,2	1,68 \pm 0,57
C22:2j	0,61 \pm 0,21	0,56 \pm 0,39	0,27 \pm 0,08	1,07 \pm 0,64
AGS	59,94 \pm 4,16	72,21 \pm 3,23	70,68 \pm 2,22	60,47 \pm 2,53
AGMI	13,49 \pm 0,80	6,49 \pm 1,22	10,68 \pm 0,94	9,87 \pm 1,15
AGPI	26,55 \pm 4,27	21,28 \pm 3,99	18,62 \pm 2,55	29,65 \pm 1,47
AGU	40,05 \pm 4,16	27,78 \pm 3,23	29,31 \pm 2,22	39,52 \pm 2,53
n-3	8,85 \pm 1,82	14,71 \pm 4,31	9,69 \pm 2,87	14,46 \pm 1,08
n-6	7,05 \pm 0,79	1,02 \pm 0,18	2,10 \pm 0,61	2,88 \pm 0,63
n-3/n-6	1,33 \pm 0,27	18,94 \pm 8,32	8,49 \pm 3,79	6,71 \pm 1,65
EPA+DHA	6,32 \pm 1,54	7,64 \pm 2,16	3,32 \pm 0,3	6,98 \pm 0,32

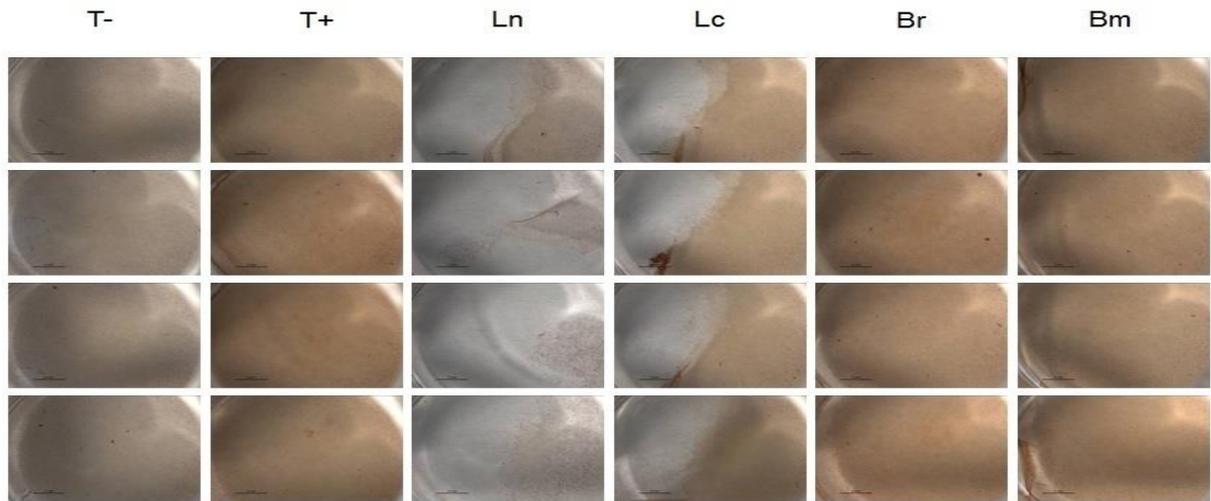


J14

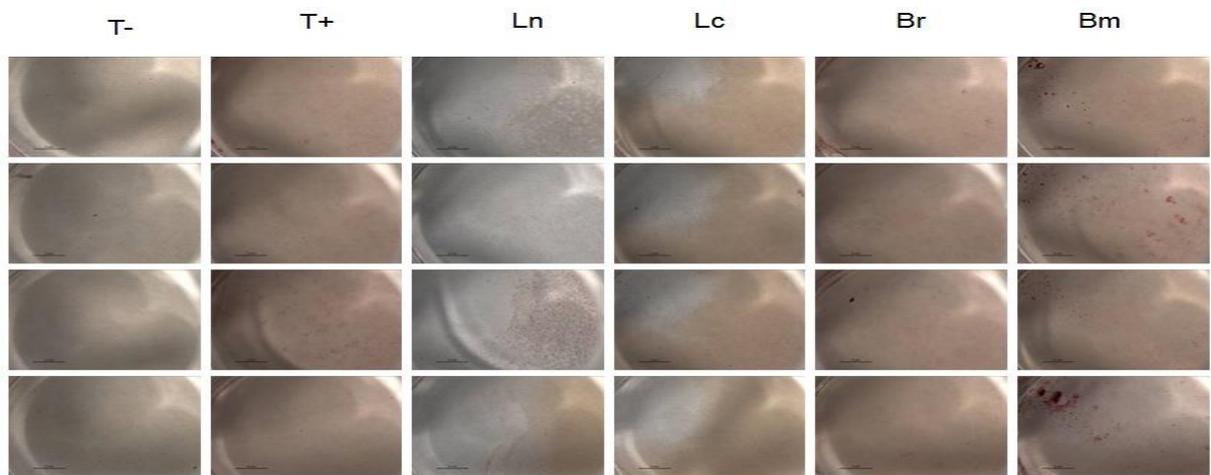
Annexe (11). Résultats des tests de minéralisation (RA, BA et RS) menés sur les pré-chondrocytes murins ATDC5 cultivées en micromasse avec les différents extraits Ln, Lc, Br et Bm à une concentration de 100µg/ml à J7, J10 et J14. La position des différents extraits est indiquée. (par colonne) (n=3). (Manip 3).



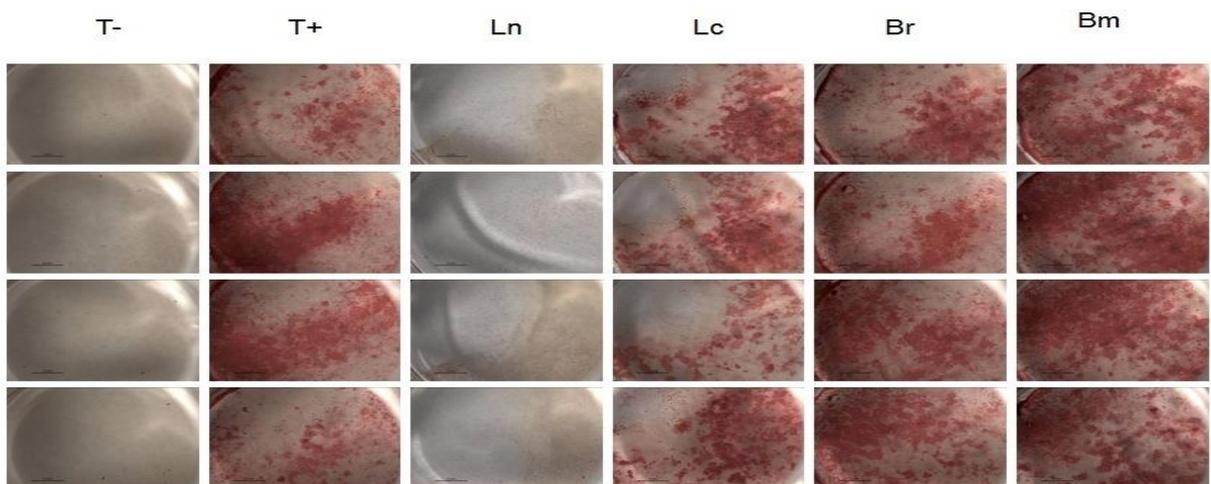
Annexe (12). Evolution au cours du temps de l'activité des différents gènes impliqués dans la chondrogénèse (col I, col II, Agrécan et col X) sur les cellules de la lignée ATDC5 cultivée en micromasse sur une cinétique de 14 jours avec des temps d'arrêt à J1, J7, J10 et J14.



J7

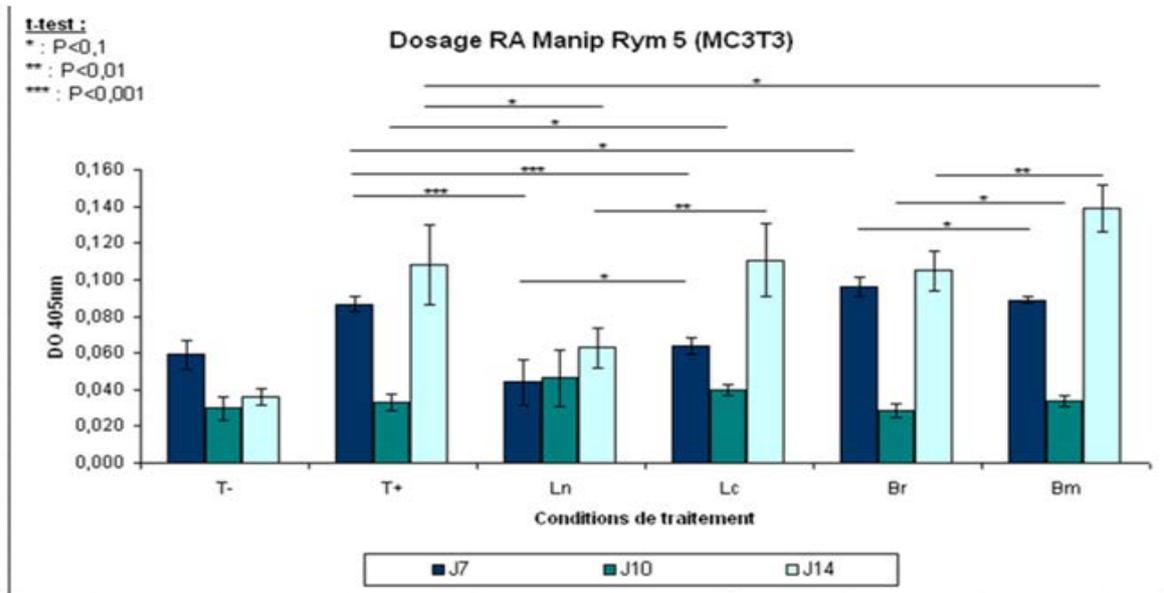


J10



(1)

J14



(2)

Annexe (13) Effets des différents extraits lipides de la nacre (Ln) et de la chair (Lc), de L'ESMr et de l'ESMm sur la capacité de minéralisation des cellules MC3T3 après 14 jours de traitement. Coloration Rouge Alizarine (1) et dosage (2). Analyse statistique : T-test ($P < 0,05^*$; $P < 0,0005^{**}$). La position des différents extraits est indiquée par colonne. (n=2).

