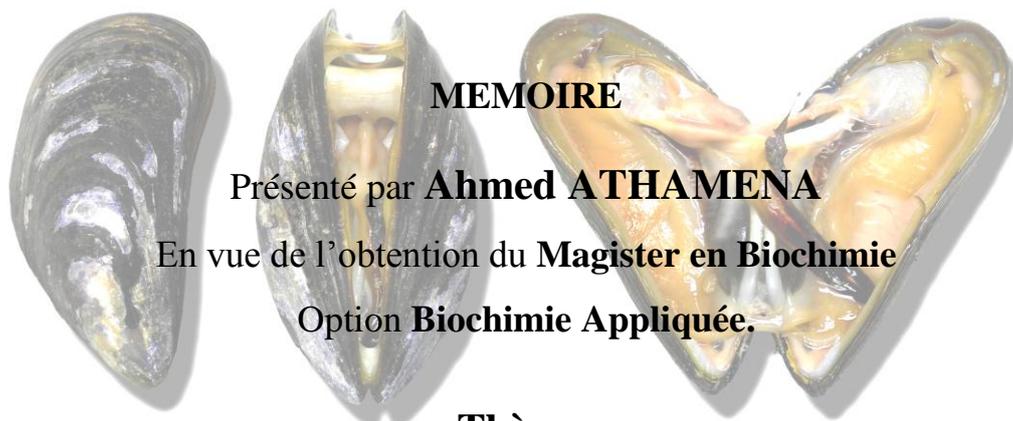


République Algérienne Démocratique et Populaire.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDR -BATNA-
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Présenté par **Ahmed ATHAMENA**

En vue de l'obtention du **Magister en Biochimie**

Option **Biochimie Appliquée.**

Thème:

**CAPACITES COMPARÉES DE DIVERS TISSUS DE LA
MOULE (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) À RÉALISER
LA BIOSYNTHESE DE LA PHOSPHATIDYL-CHOLINE (PC)
PAR VOIE DE N-METHYLATION
DE LA PHOSPHATIDYL-ETHANOLAMINE (PE).**

Devant le jury:

O. LAMBARKIA-ALOUÏ

Prof.- Université de Batna

Présidente

S. LAROUI

M.C.- Université de Batna

Rapporteur

L. ROUABAH-HAMBABA

M.C.- Université de Batna

Examineur

A. BAGHIANI

M.C.- Université de Sétif

Examineur

Année Universitaire 2007-2008

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans un laboratoire de recherche à l'Institut Michel Pacha, station de Physiologie et Biochimie Marine de l'université Claude Bernard Lyon 1 situé à la Seyne sur Mer dans le département du Var, sous la direction de Monsieur Gérard BRICHON.

J'exprime ici mes remerciements au Dr Gérard BRICHON Directeur de l'Institut Michel Pacha pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné tous les moyens pour entreprendre ce travail. Ces mêmes remerciements vont aussi au Pr. Georges ZWINGELSTEIN qui m'a beaucoup fait profiter de sa grande compétence scientifique et technique.

Je remercie également le Dr LAROUÏ Salah qui a bien voulu accepter de m'encadrer. Ses précieux conseils et l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail m'ont été d'une utilité capitale. Qu'il puisse trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame LAMBARKIA-ALOUÏ Ourida Professeur à l'université de Batna. Elle me fait un grand honneur en présidant le jury de soutenance.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Madame ROUABAH-HAMBABA Leïla Maître de conférences à l'université de Batna qui me fait l'honneur de participer au jury.

Ma profonde gratitude va aussi à Monsieur BAGHIANI Abderrahmane Maître de conférences à l'université de Sétif qui a accepté de participer au jury.

Dédicaces

Je dédie le fruit de cette étude à :

- ❖ *Mes parents, ma famille et tous mes proches car sans eux beaucoup de choses n'auraient pas été possible. Qu'ils soient assurés de mon affection et ma reconnaissance.*

- ❖ *Mon cher oncle **Noureddine ATHAMENA** et son épouse qui m'ont beaucoup aidé en de nombreuses circonstances. Sans leur soutien rien n'aurait pu être possible tout au long de ces années.*

- ❖ *Tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce modeste travail.*

Résumé

Notre travail a porté sur le métabolisme des lipides chez la moule Méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* et particulièrement de la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC), des glycérophospholipides majoritaires dans tous les tissus. Les lipides des principaux tissus: branchie, manteau, muscle, glande digestive, hémolymphe et hémocytes, ont été extraits et les diverses classes de lipides neutres et de phospholipides ont été évaluées après séparation par chromatographie sur couche mince et sur microcolonne CL-NH₂. Les quantités mesurées montrent que les rapports PC/PE sont élevés dans la glande digestive (2,23) contre 1,02 dans la branchie et 1,33 dans le manteau. Il a été recherché si cette valeur élevée pourrait provenir d'une utilisation de la PE de la glande digestive pour produire une partie de sa PC par méthylation de PE (comme observé dans le foie des poissons et l'hépatopancréas des crustacés).

La composition en acides gras des PC des divers tissus ont été mesurées par chromatographie en phase gazeuse, révélant une parenté plus élevée entre les PC de l'hémolymphe et de la glande digestive qu'avec celles des autres tissus. Des marquages *in vitro* avec la 3-[³H]-L-sérine et la 2-[³H]-éthanolamine et *in vivo* avec la 2-[³H]-éthanolamine ont révélé que tous les tissus pouvaient synthétiser la PE par sa voie directe alors que seuls la glande digestive, les hémocytes et plus faiblement le muscle pouvaient synthétiser de la PC par méthylation de la PE. Il a enfin pu être montré l'existence d'un échange de PC vers l'hémolymphe, l'organe producteur paraissant être la glande digestive, à l'exclusion des autres tissus, confirmant ainsi l'homologie de cet organe des mollusques avec le foie et l'hépatopancréas des poissons et crustacés. Cette étude a également confirmé la présence dans tous les tissus de ce bivalve de 2 lipides phosphorés particuliers qui appartiendraient à la catégorie des phosphonolipides ainsi, que l'absence de sphingomyéline.

MOTS CLES : moule (*Mytilus galloprovincialis*), métabolisme des phospholipides, phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), la voie de N-méthylation de la PE, phosphonolipides.

Summary

Our research concerned the metabolism of the lipids in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and has been focused on the two main glycerophospholipids in all the tissues: the phosphatidylethanolamine (PE) and the phosphatidylcholine (PC). The following tissues and organs have been studied: gills, digestive gland (equivalent to the liver of fishes and the hepatopancreas in crustaceans) mantle, muscle, hemocytes and hemolymph. After extraction of total lipids, the separation of the different classes (neutral lipids, phospholipids) has been carried out using thin layer chromatography and solid phase extraction on microcolumn LC-NH₂. The PC/PE ratio was higher in the digestive gland than in the gill and in the mantle (2.23 *versus* 1.02 and 1.33 respectively). The goal of this work was to study whether this high ratio was related to the use of the digestive gland PE in order to generate a part of its PC by methylation of PE (as observed in the liver of fish and the hepatopancreas of crustaceans).

The PC fatty acids composition in all tissues measured by gas chromatography, revealed a higher relationship between the PC of the hemolymph and digestive gland rather than the other tissues. *In vitro* labelling with 3-[³H]-L-serine and the 2-[³H]-ethanolamine and *in vivo* labelling with the 2-[³H]-ethanolamine revealed the ability of all tissues synthesize their PE through the direct pathway (via CDP-ethanolamine), whereas only the digestive gland, the hemocytes and more slightly, the muscle could synthesize PC by methylation of the PE. Finally, we have shown it exists an exchange of PC towards the hemolymph, the producing organ being the digestive gland, but not the other tissues, which confirms the homology of this molluscs organ with the liver and the hepatopancreas of fish and crustaceans. This study also confirms the presence, in all the tissues of this bivalve, of 2 lipids which would belong to the category of the phosphonolipids as well as the absence of sphingomyelin.

KEY WORDS: mussel (*Mytilus galloprovincialis*), metabolism of phospholipids, phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), PE methylation pathway, phosphonolipids.

ملخص

تعلق بحثنا بأبيض الهون في بلح البحر نوع ميتيليس جالوبروفينسياليس المنتشرة في البحر الأبيض المتوسط وبشكل خاص على: الفوسفاتيديل إيثانول أمين و الفوسفاتيديل ثولين التي هي تمثل الجليبيروفوسفوليبيدات الرئيسية في كل الأنسجة المدروسة. بعد استخلاص الدهون الكلية من الأنسجة والأعضاء التالية: الخياشيم، الغدة الهضمية (المعادلة لكبد الأسماك و الهيئات بانكرياس في الحيوانات القشرية) المعطف، العضلة، خلايا الدم الحمراء والبلازما (هيمولف)، تم فصل الطبقات المختلفة (دهون حيادية و فوسفوليبيدات) عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، و كروماتوغرافيا على العمود وبعد القياس الكمي للفوسفوليبيدات تبين أن نسبة الفوسفاتيديل إيثانول أمين إلى الفوسفاتيديل ثولين كانت أعلى في الغدة الهضمية من الخيشوم و المعطف (2.23 ضد 1.02 و 1.33 على التوالي) ومن هنا كان هدف هذه الدراسة هو معرفة إذا ما كانت هذه النسبة العالية في الغدة الهضمية ناتجة عن استخدام الفوسفاتيديل إيثانول أمين لكي تصنع جزءاً من الفوسفاتيديل ثولين عن طريق المثيلة (كما لوحظ في كبد الأسماك و هيئات بانكرياس الحيوانات القشرية).

الأحماض الدهنية المكونة للفوسفاتيديل ثولين لمختلف الأغشية تم تعيينها بواسطة كروماتوغرافيا المرحلة الغازية واتضح أن هناك شبه كبير بين الفوسفاتيديل ثولين للبلازما و الغدة الهضمية على عكس الأغشية الأخرى. نتائج تعليم الأنسجة في الأنبوب بواسطة الحمضين الأمينيين سرين و الإيثانول أمين المشعين و تعليم قدم بلح البحر حي بواسطة الإيثانول أمين المشع، بينت أن كل الأنسجة بإمكانها تصنيع الفوسفاتيديل إيثانول أمين من خلال المرحلة المباشرة (عبر سي دي بي إيثانول أمين)، بينما فقط الغدة الهضمية، خلايا الدم الحمراء وأقل تقديراً العضلة التي يمكنها تصنيع الفوسفاتيديل ثولين عن طريق مثيلة الفوسفاتيديل إيثانول أمين، وفي الأخير، من خلال نتائج تحليل الأحماض الدهنية تبين أن هناك تبادل في الفوسفاتيديل ثولين نحو البلازما (الهيمولف) و يظهر أن العضو المصنع هو الغدة الهضمية باستثناء الأنسجة الأخرى مما يؤكد تشابه الغدة الهضمية لبلح البحر مع كبد الأسماك و هيئات بانكرياس الحيوانات القشرية. من خلال هذه الدراسة أيضاً تبين وجود في كل أنسجة بلح البحر إثنان من الليبيدات المفسفرة الخاصة التي تنتمي إلى قسم الفسفونوليبيدات، كما تبين أيضاً غياب السفنجوليبيد في كل الأنسجة.

الكلمات المفتاحية: بلح البحر نوع ميتيليس جالوبروفينسياليس، أبيض الفوسفوليبيدات، فوسفاتيديل إيثانول أمين،

فوسفاتيديل ثولين، مثيلة الفوسفاتيديل إيثانول أمين إلى الفوسفاتيديل ثولين، الفسفونوليبيدات.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
MATERIEL ET METHODES.....	13
I- MATERIEL BIOLOGIQUE	13
I-1-Nature des tissus et organes étudiés.....	13
II- TECHNIQUES BIOLOGIQUES.....	14
II-1-Mode de prélèvement des tissus	15
II-2-Etudes <i>in vitro</i>	16
II-3-Expérimentations <i>in vivo</i>	17
III- PRECURSEURS RADIOACTIFS UTILISES	18
III-1 Caractéristiques des précurseurs	18
III-2 Justification de leur choix	18
III-2-1-La sérine	18
III-2-2-L'éthanolamine.....	19
IV- PROTOCOLE GENERAL D'ANALYSE DES LIPIDES	20
IV-1: Extraction du matériel lipidique des tissus	21
IV-2: Purification de l'extrait lipidique	21
IV-3: Détermination du poids de lipides totaux	22
IV-4: Séparation des phospholipides par CCM.....	23
IV-5: Détermination de la radioactivité des divers échantillons	28
IV-6: Extraction des fractions de lipides sur micro colonne SPE-LC-NH ₂	29
IV-7: Analyse des acides gras constitutifs des PC purifiées	32
V- EXPRESSION DES RÉSULTATS ET STATISTIQUES UTILISÉES.....	36

RESULTATS.....	37
I- TENEURS EN LIPIDES TOTAUX, PHOSPHOLIPIDES ET LIPIDES NEUTRES DES DIFFERENTS TISSUS	37
II- PROFILS DE REPARTITION DES DIVERSES FRACTIONS LIPIDIQUES	40
III- ETUDE DES LES LIPIDES NEUTRES TOTAUX	45
IV- ETUDE <i>IN VITRO</i> DES CAPACITES DES TISSUS A SYNTHETISER <i>IN</i> <i>VITRO</i> LEURS PHOSPHOLIPIDES	46
IV-1 Résultats préliminaires au niveau du manteau	46
IV-2 Incorporation <i>in vitro</i> de 2-[³ H]-Ethanolamine	48
IV-3 Incorporation <i>in vitro</i> de 3-[³ H]-L Sérine	50
V- ETUDE <i>IN VIVO</i> PAR INJECTION DE 2-[³ H]-ETHANOLAMINE	51
VI- COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PC DES TISSUS	56
DISCUSSION GENERALE et CONCLUSIONS.....	58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62
PERSPECTIVE.....	68
ANNEXE	71

ABREVIATION

- AGL :** Acides Gras Libres.
- AP :** Acide Phosphatidique.
- CCM :** Chromatographie sur Couche Mince.
- CDP :** Cytidine Di Phosphate.
- CPM :** Coup Par Minute.
- CTP :** Cytidine Tri Phosphate.
- DAG :** Di Acyl Glycérols ou diglycérides.
- DO :** Densité Optique.
- DOc :** Densité Optique corrigée.
- DPM :** Désintégrations Par Minute.
- DPG :** Di Phosphatidyl Glycérol ou cardiolipine.
- EM :** Eau de Mer.
- GLC :** Gaz Liquid Chromatography.
- LPC :** Lyso Phosphatidyl Choline ou lysolécitine.
- LPE :** Lyso Phosphatidyl Ethanolamine.
- LPS :** Lyso Phosphatidyl Sérine.
- LN :** Lipides Neutres.
- LT :** Lipides Totaux.
- PC :** Phosphatidyl Choline.
- PE :** Phosphatidyl Ethanolamine.

PI :	Phosphatidyl Inositol.
PL :	Phospholipides.
P. lip :	Phosphore Lipidique.
PS :	Phosphatidyl Sérine.
PUFA :	Poly unsaturated Fatty acid (Acide gras poly insaturés).
RAS :	Radio Activité Spécifique.
SPE :	Solid Phase Extrated.
SPH :	Sphingomyéline.
TBq :	Térabecquerel.
TG :	Tri Glycérides ou triacylglycérols.
THF :	Tétrahydrofurane.
TPM :	Tour Par Minute.
μ Ci :	Micro Curies.

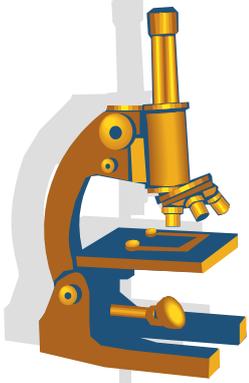
LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Décarboxylation de la PS en PE et production de la PC par N-méthylation de la PE.	02
02	Structure de la membrane plasmique.	05
03	Classification des lipides.	06
04	Structure des glycérophospholipides.	06
05	Organisation des phospholipides membranaire en bicouche lipidique.	07
06	Structure de la phosphatidylcholine.	07
07	Structure de la sphingomyéline.	08
08	Biosynthèse de la phosphatidylsérine par la voie directe.	09
09	Biosynthèse de la phosphatidylcholine par la voie CDP-choline.	11
10	Anatomie de la moule.	13
11	Récupération de l'hémolymphe et les hémocytes.	15
12	Prélèvement des tissus de la moule.	16
13	Spectromètre β (Packard 460) utilisé pour mesurer la radioactivité.	28
14	Système utilisé pour la séparation par chromatographie sur colonnes SPE-CL-NH ₂ (Solid-phase-extraction)	29
15	Chromatographie gaz liquide (GLC) utilisé pour analyser des acides gras.	34

16	Analyse des acides gras par GLC, programmation de la température multirampe.	35
17	Teneur en lipides totaux des principaux tissus, en mg % mg de poids frais	37
18	Teneur en phospholipides totaux des principaux tissus, en mg % mg de poids frais.	37
19	Teneur en lipides neutres des principaux tissus, en mg % mg de poids frais.	38
20	Valeurs en phospholipides exprimées en pour cent des lipides totaux.	39
21	CCM à deux dimensions des LT de la glande digestive après révélation par l'Iode.	40
22	CCM à deux dimensions de la fraction VI de lipides de manteau et branchie après fractionnement sur LC-NH ₂ , avant et après saponification douce par NaOH.	44
23	Distribution de la radioactivité dans les phospholipides, lipides neutres et phosphonolipides après incubation <i>in vitro</i> du manteau de la moule.	46
24	Distribution <i>in vitro</i> de la 3-[³ H]-L-Sérine dans les phospholipides et les phosphonolipides.	50
25	Distribution <i>in vivo</i> de la radioactivité de la 2-[³ H]-Ethanolamine entre les compartiments hydrosolubles et les lipides totaux des tissus de la moule de <i>M. galloprovincialis</i> .	52
26 a	Radioactivité Spécifique (R.A.S) de la PE, dpm / nmoles de PE	55
26 b	Radioactivité Spécifique (R.A.S) de la PC, dpm / nmoles de PC	55
27	Composition des principaux acides gras de la phosphatidylcholine	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Présentation des précurseurs radioactifs utilisés dans notre étude.	18
02	Composition des systèmes de solvants utilisés pour la séparation des phospholipides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice.	24
03	Répartitions des phospholipides dans les principaux tissus et organes de la moule <i>Mytilus Galloprovincialis</i> .	42
04	Proportions relatives des diverses catégories de lipides neutres.	45
05	Distribution du marquage de la 2-[³ H]-éthanolamine entre les lipides neutres, les phospholipides et les phosphonolipides de différents tissus de la moule.	48
06	Distribution <i>in vivo</i> de 2-[³ H]-éthanolamine dans les lipides neutres, les phospholipides et les phosphonolipides des différents tissus de la moule.	53
07	Radioactivité spécifique moyenne des phospholipides totaux (PL), de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidylethanolamine (PE), des 4 principaux tissus de la moule.	54
08	Composition en acides gras de la PC purifiée de l'hémolymphe, de la glande digestive, du manteau et des branchies de la moule <i>M. galloprovincialis</i> en pour-cent des AG reconnus	56



INTRODUCTION

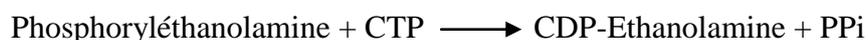
INTRODUCTION

Les phospholipides (glycéro et sphingophospholipides), ont un rôle très important dans la définition et le maintien de l'intégrité des membranes biologiques dont ils constituent la trame centrale (Kent, 1995 ; Riboni, 1997). Ces propriétés sont dues au caractère amphiphile de ces molécules qui, en plus de leur rôle de structure, interviennent dans la transmission des informations entre cellules. Ils peuvent, en effet, donner naissance aux seconds messagers dont la nature et la variété dépendent des stimuli, des enzymes et des lipides impliqués dans leur génération (Mathias, et al. 1998).

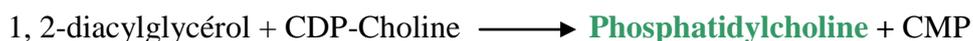
Du point de vue de la répartition des phospholipides, chez les poïkilothermes comme chez les homéothermes, la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la sphingomyéline (SPH), sont les principaux constituants des membranes (Brichon, 1984). Chez les mollusques bivalves comme la moule, la SPH paraît être absente et remplacée par un ou 2 autres phospholipides comportant une base sphingoïde et une copule aminée. D'autres composés existent également comme des phosphonolipides, caractérisés par une liaison directe carbone-phosphore et dont on ignore encore largement à l'heure actuelle les rôles éventuels.

Chez les vertébrés, plusieurs voies de biosynthèse de la PE et de la PC existent avec une activité plus ou moins intense selon l'organe et les conditions environnantes (Brichon, 1984).

Pour leur plus grande part ils sont produits à partir de 1,2-diglycérides et d'éthanolamine ou de choline activées successivement par l'ATP et le CTP sous l'action de phosphotransférases, selon les réactions suivantes: (Voet, 2005).



Une seconde étape est activée par les enzymes CTP: phosphorylcholine cytidyltransférase ou CTP: phosphoryléthanolamine cytidyltransférase. Les deux phospholipides PE et PC sont finalement obtenus par liaison d'un diacylglycérol avec le groupement phosphate de CDP-éthanolamine ou CDP-choline grâce aux enzymes: CDP-Choline: 1,2-diacylglycérol phosphotransférase et CDP-Ethanolamine: 1,2-diacylglycérol phosphotransférase (Voet, 2005).



A coté de ces voies de synthèse de PC et PE qualifiées de directes, il existe également des voies indirectes :

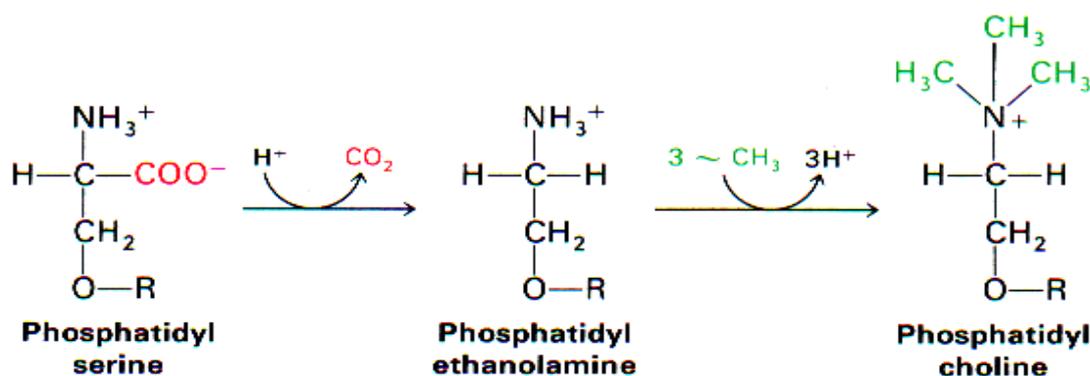


Figure 01 : Décarboxylation de la PS en PE et production de la PC par N-méthylation de la PE (Murray et al, 2002)

- **Une décarboxylation de la sérine** portée sur la PS peut également conduire à la PE. Cette réaction est catalysée par la phosphatidylsérine décarboxylase et se produit essentiellement dans les mitochondries. Cette voie peut jouer un rôle important dans la production de la PE puisque la synthèse directe de l'éthanolamine par décarboxylation de la sérine libre ne semble pas exister chez les organismes supérieurs. Il est à noter que la PE obtenue par décarboxylation de la PS peut ensuite participer à la production de PC (Bodenec, 1999).

- **Une production de PC par N-méthylation sur l'éthanolamine de la PE:** Elle est produite par transfert de 3 groupements méthyls provenant de la S-adénosyl-L-méthionine et est catalysée par des N-méthyltransférases avec formation successive de mono-méthyl et de di-méthyl PE puis de PC (Bodenec, 1999).

Des travaux antérieurs sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lubet et al, 1985) ont montré que les différents tissus ne contiennent pas les mêmes quantités de lipides totaux alors que leurs teneurs en phospholipides restent très proches. La PC et la PE sont les phospholipides les plus abondants dans tous les tissus étudiés. Les rapports PC / PE étant sensiblement voisins dans la branchie et le manteau (respectivement 1,02 et 1,33) et plus élevé dans la glande digestive (PC / PE = 2,23) où les teneurs en PE sont nettement plus faibles. Ceci indique que les métabolismes de la PC et de la PE doivent être sensiblement différents entre ces divers organes. La baisse importante de teneur en PE dans la glande digestive pourrait, entre autre, provenir d'une amplification de la synthèse de la PC par méthylation de la PE, comme cela a été observé dans le foie des poissons et l'hépatopancréas des crustacés (Abdul-Malak, 1978 ; Chapelle et al, 1982; Brichon, 1984) (La glande digestive des mollusques étant en partie un homologue de ces organes)

Ceci nous a conduit à rechercher si cette voie de production de la PC par méthylation de la PE existait réellement dans les divers tissus de ce mollusque en utilisant *in vivo* et *in vitro* des précurseurs radioactifs marqués au tritium comme la 2-[³H]-éthanolamine et la 3-[³H]-L-Sérine qui sont impliquées dans les synthèses de ces lipides.

L'utilisation *in vitro* d'éthanolamine permettra de connaître les capacités propres à chaque tissu de produire la PE et d'observer l'existence possible d'une voie de synthèse indirecte de la PC par N-méthylation de la PE.

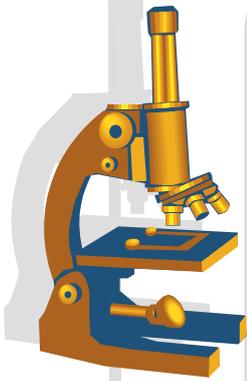
L'usage *in vitro* de sérine renseignera sur l'existence ou non d'un processus de synthèse de la PE par décarboxylation de la PS tout en confirmant ou non l'existence d'une voie de synthèse indirecte de PC par méthylation de PE.

Des expériences *in vivo* avec l'éthanolamine marquée permettront non seulement de confirmer l'existence de ces voies de synthèse dans ces tissus mais apporteront en outre des informations sur l'existence ou non de processus de transferts de phospholipides depuis les organes « producteurs » vers les tissus « demandeurs » via un compartiment « transporteur » (comme l'hémolymphe) selon des mécanismes bien mis en évidence chez les poissons (Brichon, 1984)

La comparaison des compositions en acides gras des PC extraites de l'hémolymphe et des divers tissus servira enfin à vérifier leur parenté métabolique éventuelle.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord du mettre en place et adapter à ce mollusque des techniques d'extraction et de purification des catégories de lipides des principaux tissus de la moule (branchie, glande digestive, manteau, muscle, hémocytes et hémolymphe) puis appliquer ces techniques pour suivre l'incorporation de 2-[³H]-éthanolamine et la 3-[³H]-L-Sérine *in vitro* et 2-[³H]-éthanolamine *in vivo*.

La plus grande partie de notre étude a donc été consacrée à ces mises au point.



REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Unité de base de tout être vivant, la cellule est délimitée par une membrane plasmique qui maintient les différences indispensables entre son contenu et son environnement. Cette membrane est un filtre sélectif, réglant la vie de la cellule et à plus grande échelle celle de l'organisme. Toutes les membranes biologiques, y compris les membranes plasmiques et les membranes internes des cellules, ont une structure commune : ce sont des assemblages de molécules protéiques et lipidiques, essentiellement liées par des liaisons non covalentes. Les molécules lipidiques sont organisées en une double couche continue fluide, et constituant la matrice des membranes (figure 02). Ces molécules lipidiques peuvent être réparties en deux grandes classes : les lipides neutres (cholestérol, triglycérides, acylglycérols...) et les lipides polaires (phospholipides et glycolipides).

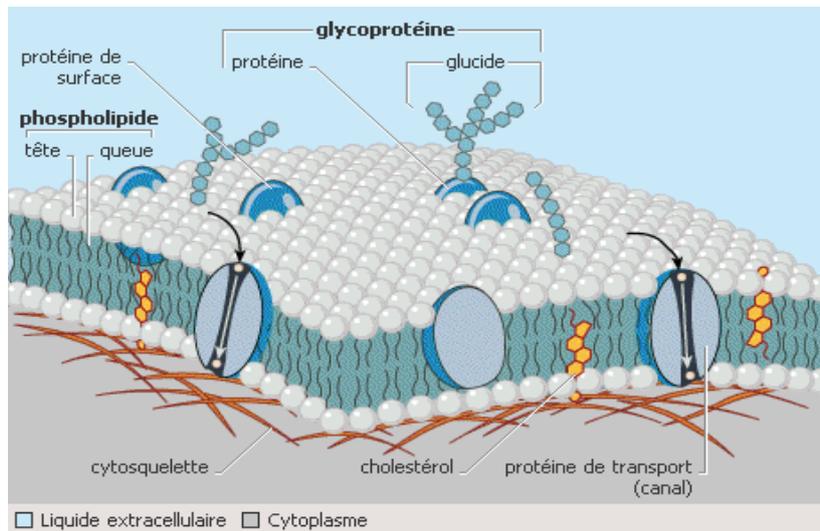


Figure 02: Structure de la membrane plasmique (Encyclopédie Microsoft Encarta, 1997).

Les lipides sont les composants majoritaires de la membrane plasmique et de l'ensemble des membranes biologiques (30 à 50% en masse). Les membranes se composent également de glucides et de protéines. Pour chaque membrane d'organites, la proportion des différents types de lipides est variable, ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles spécifiques. On peut néanmoins donner en exemples les valeurs trouvées pour le globule rouge (Gilbert, 2005)

Parmi les lipides:

55% de **phospholipides**

25% de **cholestérol**

20% de **glycolipides**

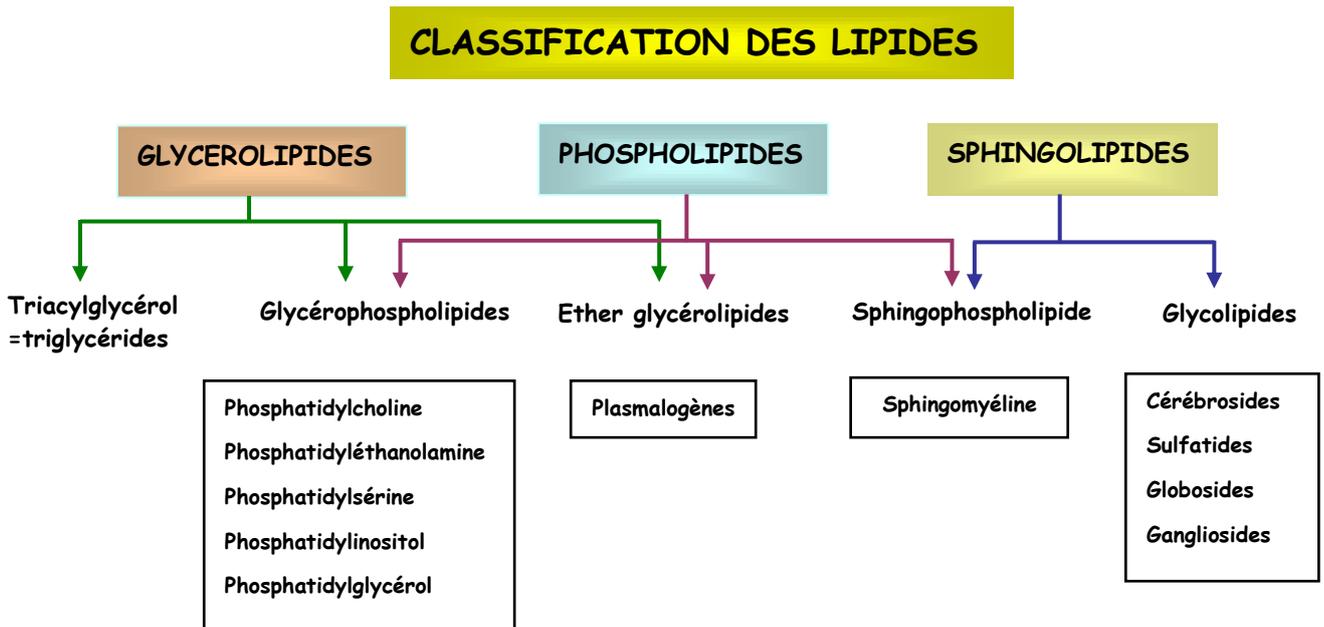


Figure 03 : Classification des lipides (Gilbert, 2005).

Les phospholipides sont des molécules allongées comportant des chaînes hydrocarbonées d'acide gras (figure 04), cette structure leur confère la propriété de former spontanément une bicouche quand ils sont dispersés dans un milieu aqueux (figure 05). Ces derniers, se répartissent de manière asymétrique entre les deux couches de la membrane dans les cellules vivantes. Ainsi les glycolipides, les phospholipides à choline, phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SPH) sont surtout localisés dans le feuillet externe alors que les phospholipides aminés, phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS) ainsi que le phosphatidylinositol (PI) sont concentrés dans le feuillet interne (Higgins et Evans, 1978).

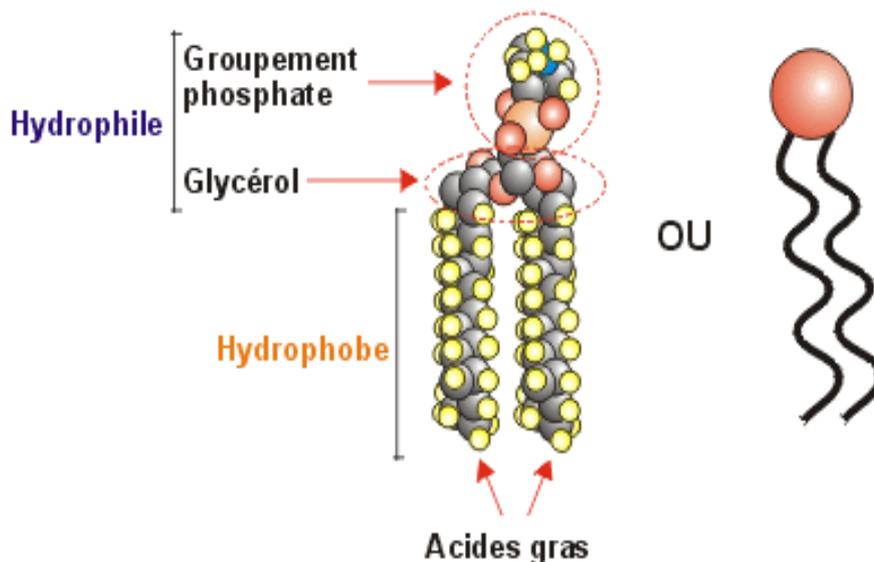


Figure 04 : Structure des glycérophospholipides (Lefur et Arnaud, 2004)

Les phospholipides ont une manière très particulière de s'organiser en présence d'eau.

Différentes structures peuvent se former dont

les plus représentatives sont les **micelles** et les **bicouches**.

Les membranes plasmiques sont des

bicouches bilipidiques avec les deux régions

hydrophiles à l'extérieur de la membrane et les

deux régions **hydrophobes** au milieu de la membrane.

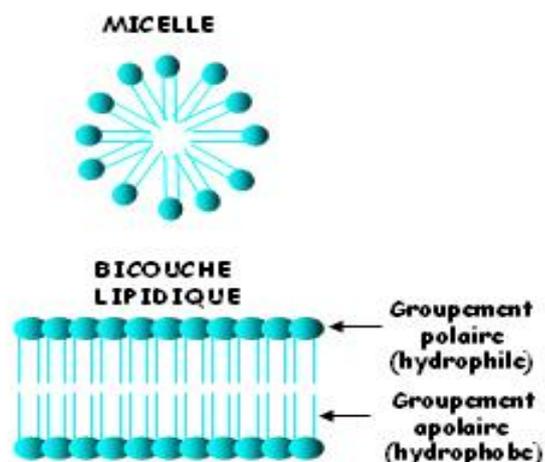


Figure 05 : Organisation des phospholipides membranaire en bicouche lipidique (Gilbert, 2005).

Les phospholipides sont rangés parallèlement les uns aux autres formant deux couches orientées tête-bêche. Cette organisation structurale permet à la membrane d'avoir un rôle de **barrière hydrophobe** entre les deux compartiments hydratés: le milieu extracellulaire et le cytosol (Gilbert, 2005).

Les glycérophospholipides (constituants majoritaires).

- Phosphatidyl-choline (PC)
- Phosphatidyl-éthanolamine (PE)
- Phosphatidyl-sérine (PS)
- Phosphatidyl-inositol (PI)
- Diphosphatidyl- glycérol (DPG)

- Acide phosphatidique (AP) (constituant mineur)

Ils sont synthétisés à partir de l'acide phosphatidique, lui même résultant de l'estérification des trois fonctions alcool du glycérol par deux acides gras en position C1 et C2 et par l'acide phosphorique en C3 (Gilbert, 2005).

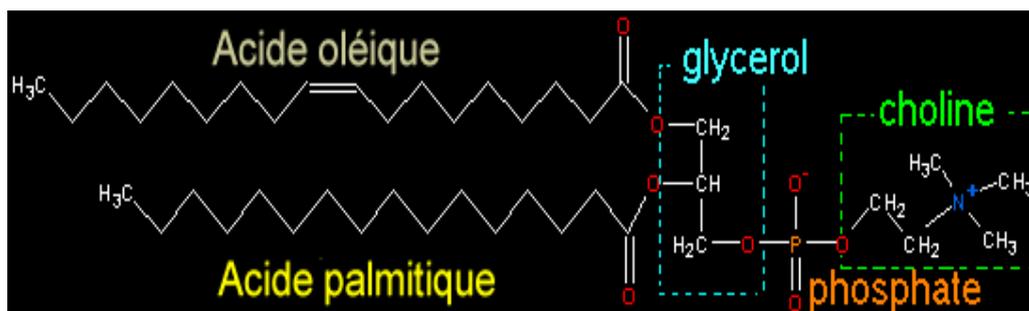


Figure 06 : Structure de la phosphatidylcholine (Gilbert, 2005).

Les sphingophospholipides :

Les sphingophospholipides majeurs sont les sphingomyélines encore appelées céramide phosphocholine. Ces sphingomyélines sont constituées par la substitution de l'hydroxyle présent sur le premier carbone d'un céramide par un groupement phosphocholine. Ce groupement constitue la tête polaire hydrophile des sphingomyélines, les céramides constituant la partie hydrophobe de la molécule (Bodennec, 1999). D'autres sphingomyélines ont été décrites où la phosphocholine de la tête polaire est substituée par de la phosphatidyléthanolamine (Malgat et al, 1986). Ces sphingophospholipides sont majoritairement présents dans le feuillet externe des membranes cytoplasmiques (Ballou, 1992 ; Van Echten, and Sandhoff, 1993).

Les céramides sont composés d'une base sphingoïde acylée sur son groupement amine. L'acide gras fixé sur ce groupement est souvent saturé et comporte une longueur de chaîne généralement comprise entre 16 et 24 atomes de carbones (Bodennec, 1999).

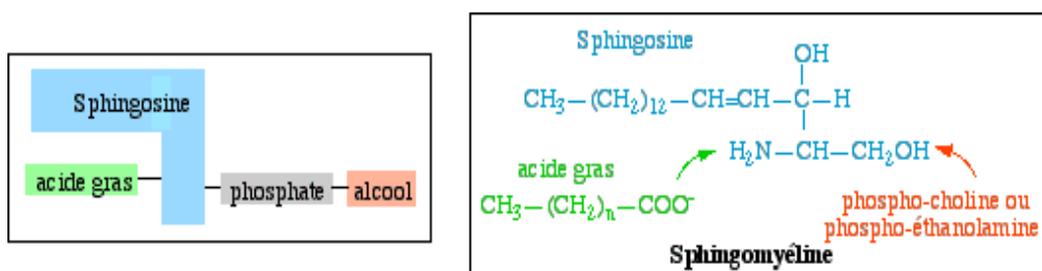


Figure 07 : Structure de la sphingomyéline (Denoulet et al, 2005)

Pendant de nombreuses années, l'importance de ces lipides membranaires ne fut perçue qu'en tant que molécules de structure. L'abondante littérature concernant les phospholipides montre désormais qu'ils sont loin d'être cantonnés dans cette seule fonction. Outre leur rôle dans la détermination de la fluidité membranaire, il est apparu qu'ils pouvaient moduler fortement toute l'activité de la cellule, les phospholipides étant une réserve de médiateurs impliqués dans la traduction de signaux chimiques ou électriques. Ils peuvent en effet être à l'origine de signaux locaux capable d'activer ou de désensibiliser des cellules voisines pour amplifier ou au contraire atténuer une réaction tissulaire. Un exemple illustrant ceci est le cas de phosphatidylinositol.

Les glycérophospholipides ont tous pour base structurale commune l'acide phosphatidique (AP), hormis les lysoglycérophospholipides qui sont normalement présents en faibles quantités dans les tissus. Cette AP, qui peut provenir de l'acylation du glycérol

phosphate ou de dihydroxyacétone phosphate, sert de précurseur à la synthèse des autres glycérophospholipides par deux voies distinctes: (Bodennec, 1999)

1. La première après conversion de l'acide phosphorique en diacylglycérol par l'acide phosphatidique phosphatase,
2. La seconde par transformation du phosphatidate en CDP-diacylglycérol (Kent, 1995).

Les glycérophospholipides sont alors synthétisés à partir de ces deux précurseurs.

Les glycérophospholipides les plus représentés chez les poissons et les crustacés sont les mêmes que ceux trouvés chez les mammifères, c'est-à-dire la PC, PE, PS, PI et DPG (Bodennec, 1999).

La phosphatidylsérine peut être considérée comme un produit fin de réaction et un produit intermédiaire de certaines voies de biosynthèse. La phosphatidylsérine peut être synthétisée à partir de CDP-diacylglycérol chez les levures (figure 08) et par échange de base avec la PE et la PC (Schéma n°1) chez les mammifères (Kent, 1995).

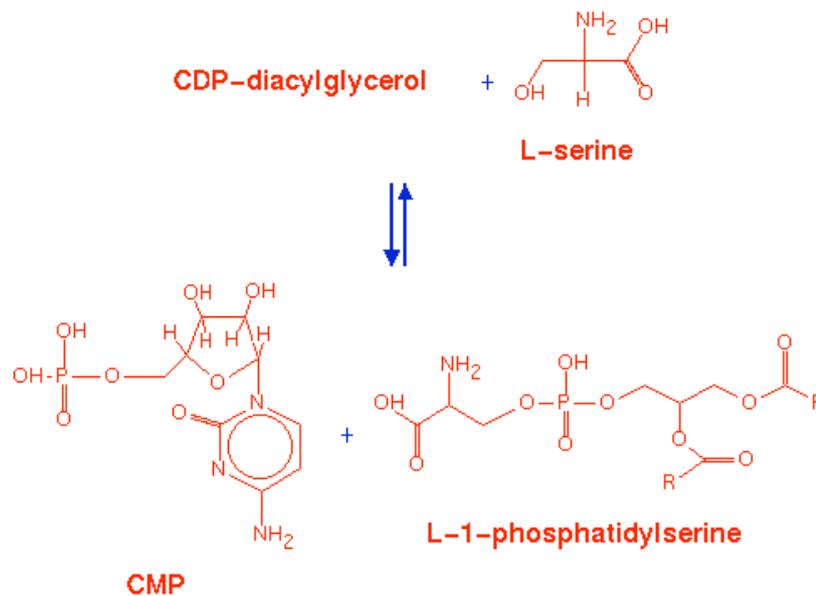


Figure 08: Biosynthèse de la phosphatidylsérine par la voie directe (Delhaize, 1999).

La PS ainsi formée peut être alors décarboxylée par phosphatidylsérine décarboxylase pour former la PE. Cette PE peut provenir de la voie CDP-éthanolamine (Schéma n°1). Toutefois il a été rapporté que dans différentes lignées cellulaires des mammifères, la voie majeure de synthèse de la PE se fait par décarboxylation de la PS (Voelker, 1984). La synthèse de la phosphatidylsérine se déroule dans le réticulum endoplasmique alors que sa décarboxylation en PE est un phénomène intramitochondrial (Vance, 1991).

La phosphatidylcholine peut provenir de deux voies différentes : la voie CDP-choline ou la voie de méthylation de la PE en PC (Vance, and choy.1979). Chez les mammifères la voie prédominante de la biosynthèse de la PC est la voie CDP-choline (figure 09) excepté dans le foie où la méthylation de la PE en PC est la voie principale (kent, 1995).

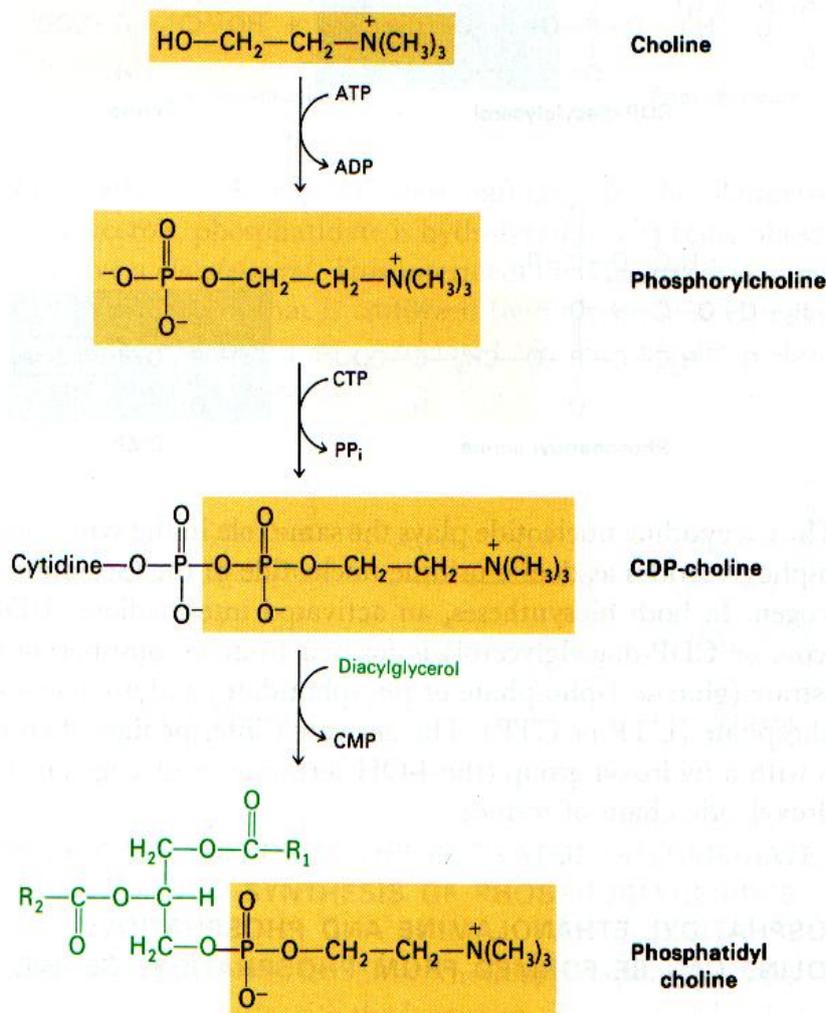


Figure 09: Biosynthèse de la phosphatidylcholine par la voie CDP-choline (Voet, 2005).

La voie de synthèse de la PC par méthylation de la PE utilise la S-adénosyl méthionine comme donneur du groupement méthyl. La méthionine est donc, comme la sérine, un acide aminé important dans la synthèse des glycérophospholipides (Bodennec, 1999) (comme montré sur le schéma n°= 1). En plus de son utilisation pour la synthèse du glycérol, la sérine sert de précurseur pour la tête polaire de la PS, PE, PC et la sphingomyéline ainsi que leur lysodérivés (Yeung, and Kuksis. 1976).

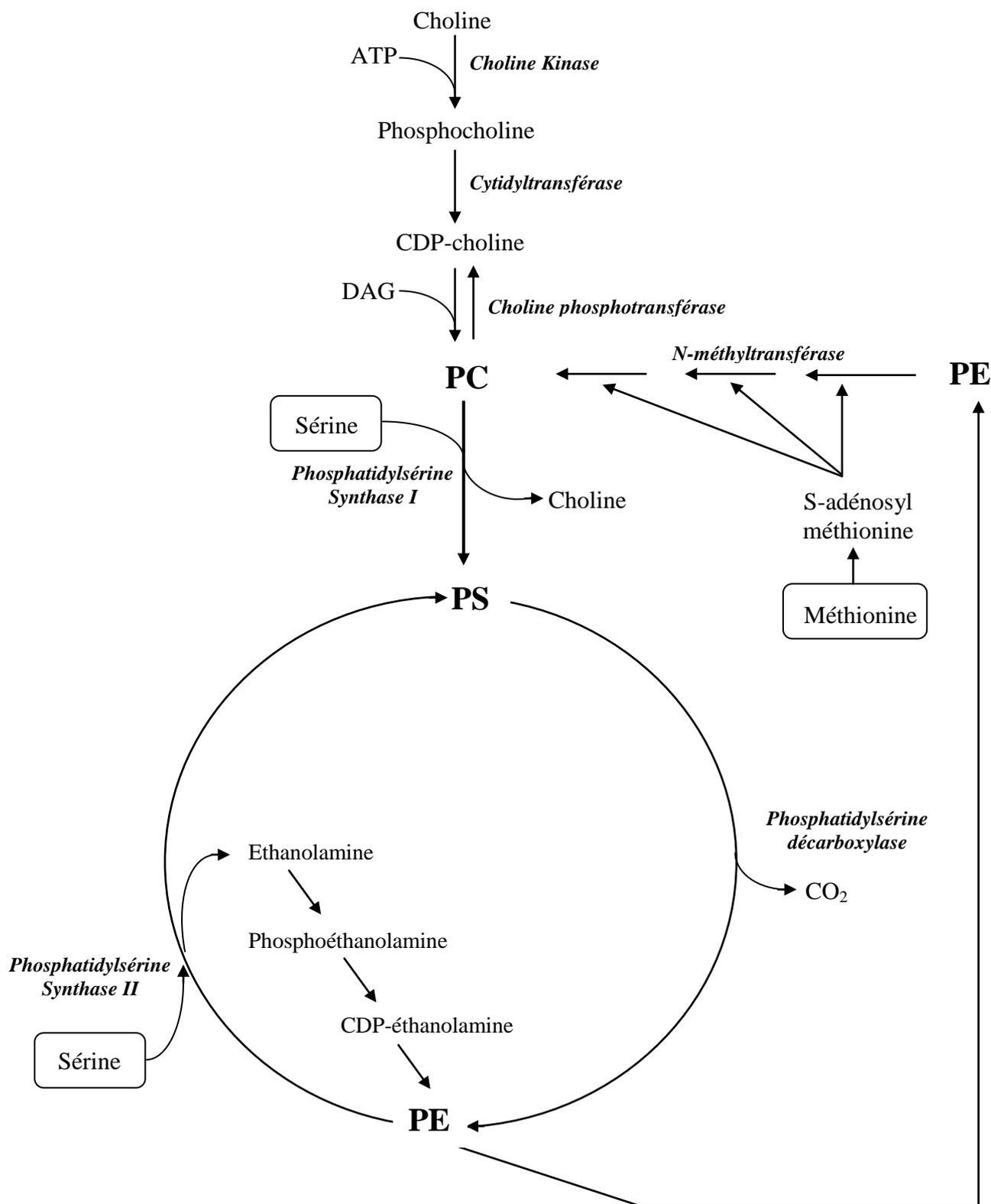


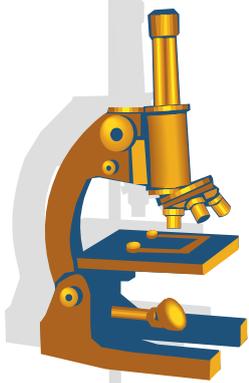
Schéma n°1: Rôle de la sérine et de la méthionine dans la synthèse des glycérophospholipides (Bodennec, 1999).

Les lipides de divers tissus d'un certain nombre d'espèces bivalves ont été passés en revue par Joseph (1982) et Voogt (1983). Les variations saisonnières des principaux constituants lipidiques des moules *Mytilus galloprovincialis* cultivées dans la rade de Toulon ont été étudiées par (Martin et al, 1970). Chez cette espèce l'activité sexuelle a lieu entre l'automne et le printemps suivant. Pendant cette période on observe plusieurs émissions de gamètes (Novembre, Février, Mai et Juin), cette période étant suivie d'une étape de repos à partir de Juillet jusqu'à Septembre avec un développement caractéristique d'un stockage de glycogène.

Quelques informations sont disponibles sur le transport des lipides par l'hémolymphe dans lequel les phospholipides représentent 70 à 90% des lipides totaux (Baynes 1973 : *Mytilus Edulis* ; Thompson 1977 : *Placopecten Magellanicus* ; Hoskin et Hoskin 1977 : *Mercenaria Mercenaria*; Allen et Conley 1982 : *Crassostrea Gigas* ; Pollero et al 1985: *Diplodon Delodontus*). Au moyen d'acides gras marqués au ¹⁴C inclus dans le régime, l'existence du transfert de lipides marqués à partir de l'hémolymphe vers les divers organes de ces bivalves a été montrée par Allen et Conley (1982) ainsi que par Pollero et al. (1985). Mais les données sur leur métabolisme restent fragmentaires.

Seule une série de travaux effectués à l'Institut Michel Pacha ont apporté des éléments importants sur le métabolisme des lipides au cours du cycle sexuel de ces bivalves (Lubet et al, 1985). Ils ont ainsi montré que dans le manteau de ces animaux, organe contenant les gamètes mâles ou femelles le phosphatidylinositol présente un métabolisme différent suivant le sexe des animaux observés (Lubet et al, 1986).

Toutes ces observations demeurent fragmentaires mais montrent que de fortes variations des activités hormonales doivent exister chez ces animaux durant leur cycle de vie. En particulier il devient évident que la synthèse, le transport et la dégradation des phospholipides vont subir des remaniements importants au cours des différentes périodes de vie de ces animaux. Toutes ces raisons nous ont encouragés à définir les différentes voies de biosynthèse des glycérophospholipides azotés afin de mieux connaître le métabolisme lipidique dans les principaux tissus de la moule de méditerranée (*Mytilus galloprovincialis*).



MATERIEL
&
METHODES

MATERIEL & METHODES

I- MATERIEL BIOLOGIQUE:

Notre étude a été menée sur un organisme marin : le mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) qui est une espèce très largement dominante en Méditerranée.

Les moules utilisées dans cette étude sont toutes issues d'une ferme aquacole située en rade du Lazaret, en face du laboratoire station de physiologie et biochimie marine situé à la Seyne sur Mer (Tamaris). Dès leur arrivée, elles sont d'abord acclimatées dans des bassins en circuit fermé pour vérifier leur état sanitaire puis sont ensuite conservées en petits groupes dans des bassins alimentés en eau de mer filtrée. La température est maintenue constante, ainsi que la photopériode (12 heures d'éclairage / 24 heures), la disponibilité en oxygène restant supérieure à 6 mg d'O₂ / litre d'eau par injection de micro bulles d'air. Les animaux ne reçoivent aucune nourriture pendant toute la durée de leur stabulation.

I-1- Nature des tissus et organes étudiés :

Notre étude a porté sur les tissus suivants :

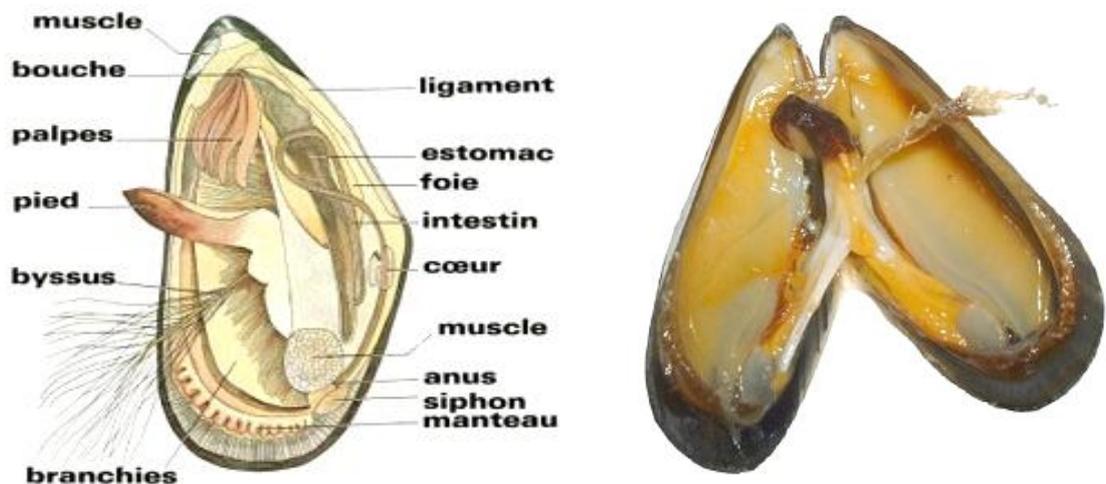


Figure 10 : Anatomie de la moule (Comité National de la Conchyliculture, 2006)

- ✓ **la branchie** : organe à la fois impliqué dans les processus de respiration et d'alimentation car jouant le rôle d'un filtre permettant la capture de plancton de taille spécifique puis leur transfert vers le tube digestif.
- ✓ **le muscle** : la fermeture générale des valves est assurée par deux muscles adducteurs (antérieur et postérieur). Ces muscles sont antagonistes du ligament, qui grâce à son élasticité assure l'ouverture de la coquille.
- ✓ **la glande digestive** : elle assure la digestion et l'absorption des aliments captés par la branchie. Cet organe est encore appelé hépatopancréas car il joue chez cet invertébré un rôle analogue au foie des Vertébrés (Pagliassoti, 1994).
- ✓ **le manteau** : organe enveloppant l'ensemble de la masse animale et assumant à la fois la sécrétion de la coquille et le rôle de support des gonades.
- ✓ **des cellules du « sang »** appelées **hémocytes** : Il s'agit de cellules circulant dans l'hémolymphe et présentant des caractéristiques de certains leucocytes des Vertébrés. Cellules totipotentes, elles interviennent dans les processus de régénération de la coquille et des tissus en cas de blessure et participent à la protection sanitaire (immunité non spécifique) en phagocytant de petites particules et des micro-organismes (Fisher, 1988).
- ✓ **l'hémolymphe** : une fois éliminés les hémocytes, c'est l'équivalent du plasma des Vertébrés. Chez la moule, ce compartiment correspond essentiellement du point de vue de sa composition saline à l'eau de mer environnante (Lubet, 1969). Il contient aussi quelques protéines et des lipides, circulant sous forme de globules ou de vésicules (Martin et al, 1970).

II- TECHNIQUES BIOLOGIQUES :

Les capacités à synthétiser les phospholipides des principaux tissus du mollusque ont été mises en évidence par deux approches expérimentales complémentaires:

- ❖ *in vitro* par incubation d'échantillons d'organes et de cellules isolés dans de l'eau de mer filtrée sur un filtre 0,22 microns (ce diamètre a été choisi pour son bon rendement d'élimination des bactéries et des microorganismes) en présence de précurseurs radioactifs: la 2-[³H]-éthanolamine et la 3-[³H] L-sérine (Lubet et al, 1985). Ce travail permet de préciser les capacités propres à chaque tissu pour réaliser les synthèses de

leurs phospholipides azotés hors de toute influence humorale, neuroendocrinienne ou relevant de mécanismes de transfert de lipides entre organes via l'hémolymphe.

- ❖ *in vivo* en suivant l'incorporation de 2-[³H]-éthanolamine et par comparaison des radioactivités spécifiques des phospholipides des différents tissus, cette procédure permet d'estimer s'il y a des échanges entre un ou des organes de production et des tissus « accepteurs » tout en confirmant la réalité des voies de synthèse observées *in vitro*.

II-1- Mode de prélèvement des tissus :

➤ Hémolymphe et hémocytes :

Pour leur récupération, la coquille des moules est séchée et le muscle adducteur postérieur est sectionné, entraînant l'ouverture des valves. Le liquide de la cavité palléale s'écoule instantanément et un essorage rapide de la masse corporelle avec du papier absorbant permet l'élimination maximale du milieu palléal résiduel. L'animal est ensuite laissé valves écartées sur un entonnoir permettant de récupérer l'hémolymphe et les cellules circulantes (figure 11). Après centrifugation (3000 tpm, pendant 10min.) les cellules précipitent et le surnageant (équivalent du plasma) est récupéré dans un flacon de verre de 125 ml en vue d'en extraire les composés lipidiques après une nuit de lyophilisation pour éliminer l'eau.

Les cellules restées fixées sur le fond du tube sont elles-mêmes mises en suspension dans du méthanol pur et collectées dans un flacon de verre. L'extraction du matériel lipidique est achevée par ajout du « Folch 2/1 » qu'est un mélange de chloroforme – méthanol dont les proportions (2 volumes / volume respectivement). Ce mélange sera simplement appelé Folch par la suite.



Figure 11 : Récupération de l'hémolymphe et des hémocytes

➤ **Branchies, glande digestive, muscle et manteau :**

Sont récupérés par dissection (figure 12). Après essorage sur papier filtre humidifié, ces tissus sont récupérés dans des fioles de 125 ml en verre tarés (flacons à col de santé). Après pesée pour déterminer le poids de tissu à analyser, l'extraction des lipides est réalisée par ajout du Folch à raison de 20 ml du « Folch 2/1 » par gramme du tissu.



Figure 12 : Prélèvement des tissus de la moule.

II-2-: Etudes *in vitro*

II-2-1-Prélèvement et incubation des principaux organes:

Après sacrifice, les tissus (branchies, manteau, muscles et glande digestive) sont immédiatement prélevés, rincés dans de l'eau de mer filtrée et mis à incuber entre 1 et 3 heures dans 5 ml d'eau de mer stérile en présence du précurseur radioactif choisi. L'ensemble est mis sous agitation à 80 oscillations / min, dans un incubateur type Dubnoff maintenu à température constante $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ selon les circonstances (Lubet et al ; 1985).

II-2-2- Milieux d'incubation:

L'eau de mer (EM) utilisée est celle du milieu dont proviennent les moules. Elle est filtrée à $0,22 \mu\text{m}$ pour en éliminer l'ensemble des bactéries et des microorganismes. Son pH est voisin de 7.8 et l'oxygénation est assurée par barbotage d'air humidifié pendant 20 à 30 min. Après introduction des tissus, les incubations sont réalisées en flacons ouverts, sous agitation permanente (oxygénation naturelle). Chaque flacon reçoit avant l'introduction des

tissus une quantité de radio traceur fixée à 100 microcuries (soit 10 microlitres de la source de Sérine* ou d'Éthanolamine*

II-2-3- Traitement des tissus après incubation

A l'issue de la période d'incubation, les échantillons sont rapidement essorés sur un papier filtre humide et rincés dans leur milieu d'incubation correspondant mais sans radio traceur (milieu froid). Cette opération est répétée 3 fois pour éliminer le maximum de précurseur radioactif pouvant rester adsorbée sur la surface des tissus. Ces derniers sont alors essorés 3 fois sur un lit de 3 papiers filtre secs, pesés dans le flacon où se fera le broyage en présence du « Folch 2/1 ». Puis broyés.

II-3- Expérimentations *in vivo* :

Des moules ont été placées dans des bassins en eau de mer courante à 17°C pendant deux semaines avant l'expérimentation, chaque moule reçoit une injection unique dans le pied de 100 µCi de 2-[³H]-éthanolamine, en solution dans de l'eau de mer filtrée sur filtre de 0,22 µm. Pour réaliser cette injection, on place une cale entre les valves de la coquille, ménageant ainsi une ouverture permettant de voir le pied et d'introduire l'aiguille d'une micro seringue « Hamilton » (Lubet et al ; 1985).

Après l'injection, les moules sont replacés individuellement dans des bacs de 5 litres et l'alimentation des bassins en eau est interrompue pour évaluer à terme l'importance d'une éventuelle ressortie du traceur, le volume total injecté étant de 10 µl.

Après 72 heures de marquage, les différents organes de moules sont récupérés et pesés. L'hémolymphe est récupérée comme précédemment, par section du muscle adducteur postérieur, dans des tubes en plastiques. Après centrifugation le culot d'hémocytes est lavés 2 fois avec de l'eau de mer stérile puis les lipides extraits et traités comme décrit ci dessous.

NB : seuls quelques essais ont été effectués in vivo, compte tenu des difficultés techniques et de la durée de notre stage de recherche.

III- PRÉCURSEURS RADIOACTIFS UTILISÉS:

III-1- Caractéristiques des précurseurs

Tableau 01 : Présentation des précurseurs radioactifs utilisés dans notre étude.

Précurseurs	Activité spécifique	Origine
3-[³ H]-L-sérine OHCH ₂ CH(NH ₂)COOH	30 Ci/mmol 1,11 TBq/mmol	Amersham France
2-[³ H]-éthanolamine OHCH ₂ -CH ₂ -NH ₂	29,8 Ci/mmol 1,10 TBq/mmol	Amersham, France

III-2-Justification de leur choix

III-2-1- La Sérine

Son squelette aminocarboné est un précurseur pour la synthèse des diverses classes de glycérolipides neutres et complexes par sa transformation partielle en glycérol. Il participe aussi, de manière plus spécifique, à la synthèse des glycérophospholipides azotés: PS, PE., PC ainsi que des bases sphingoïdes communes à la SPH et à tous les autres sphingolipides. Ces voies de synthèse ont été mises en évidence dans divers organes des poissons (Zwingelstein, 1979; Abdulmalak, 1978; Meister, 1980; et Brichon, 1984).

La Sérine permettra donc d'observer les capacités des tissus à synthétiser les glycérophospholipides azotés (PS, PE, PC) et non azotés (PI, DPG) et les glycérophosphonolipides azotés ainsi que les bases sphingoïdes des sphingolipides et des sphingophosphonolipides éventuellement présents chez ce mollusque.

III-2-2-L'Ethanolamine

Cette molécule est le précurseur direct de la PE dont elle constitue la copule azotée et renseignera donc sur les capacités des tissus à synthétiser ce phospholipide. Elle peut également conduire à la synthèse de certains phosphonolipides renfermant de l'éthanolamine à la place de la choline (glycéro et sphingo phosphonolipides)

L'Ethanolamine administrée en conditions *in vitro* permettra également de mettre en évidence si tous les tissus de la moule (ou seulement certains d'entre eux) possèdent la capacité à produire de la PC par N-méthylation de la PE, puisque toute apparition de PC radioactive ne pourra tirer son origine que par méthylation directe de la copule éthanolamine fixée sur la PE.

IV- PROTOCOLE GENERAL D'ANALYSE DES LIPIDES

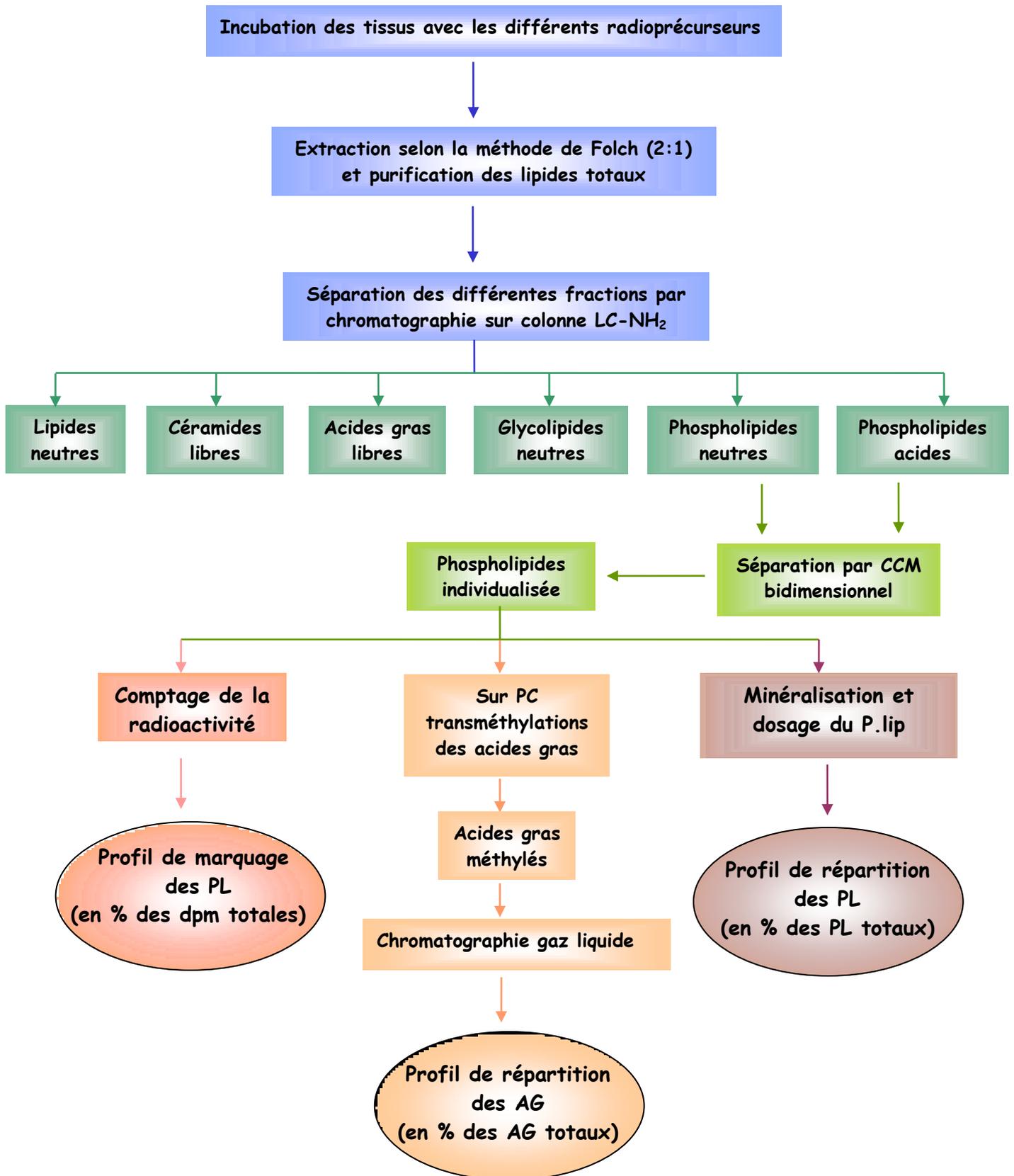


Schéma n=2: Protocole générale d'analyse des lipides.

IV-1- Extraction du matériel lipidique des tissus:

Elle est réalisée en présence du « Folch 2 / 1 » mélange de chloroforme – méthanol (2:1, v/v) mis au point par (Folch et al, 1957). Ce mélange permet l'extraction homogène, à température du laboratoire, de la plupart des composés lipidiques présents dans les tissus.

Les échantillons sont broyés dans le Folch (20 ml/gramme de tissu) avec un broyeur type Polytron équipé d'un barreau Inox (modèle PT OD 10). Le barreau est rincé entre chaque opération par 10 ml de Folch, ajoutés ensuite au broyat précédent.

Après 30-50 min. à température du laboratoire pour assurer une bonne extraction du matériel lipidique, les échantillons sont alors:

- ✓ soit filtrés sur papier filtre sans cendre avec rinçage du culot par 10 ml de Folch.
- ✓ soit centrifugés 10 min à 2500 tpm. Le surnageant est récupéré et le culot ré extrait par 5 ou 10 ml de Folch (15 à 20 min) puis centrifugé à nouveau, le surnageant étant ajouté au premier.

IV-2 - Purification de l'extrait lipidique:

Les contaminants hydrosolubles non lipidiques éventuellement entraînés avec le Folch sont éliminés par 2 ou 3 lavages successifs avec une phase aqueuse. C'est tout particulièrement le cas de la sérine et l'éthanolamine qui sont très hydrosolubles et dont la radioactivité intrinsèque est évidemment très grande par rapport à celle des lipides dont elles sont les précurseurs.

IV-2-1-Première purification:

Elle est réalisée par addition d'une solution aqueuse de KCl à 0,25 %, à raison de 1/4 du volume total de filtrat. Après agitation, deux phases distinctes se forment :

- * Une phase inférieure, chloroformique, contenant les lipides
- * Une phase supérieure contenant l'eau, le méthanol et les contaminants hydrosolubles.

Cette dernière est éliminée par aspiration à la trompe à vide.

IV-2-2-Deuxième purification:

Les proportions du Folch (2:1, v/v) sont d'abord restaurées par addition de méthanol absolu (1/3 du volume de Folch initial) à la phase chloroformique restante. Le second lavage est alors effectué avec de l'eau désionisée, dans les mêmes proportions que le premier. La phase supérieure étant éliminée après agitation.

***NB :** Avec la sérine et l'éthanolamine radio-marquées, ce second lavage est doublé pour bien éliminer toute contamination par du précurseur libre (ou certains de ses métabolites hydrosolubles). La radioactivité de la phase lipidique totale ainsi purifiée est ensuite mesurée sur des prélèvements aliquotes.*

Au cours des deux étapes de purification, la séparation des phases est aidée soit par un passage bref au bain marie à 40°C, soit par centrifugation, suivant les volumes totaux d'extraits. L'homogénéisation de la dernière phase chloroformique est assurée par ajout de 10 ml d'éthanol absolu.

IV-3- Détermination du poids de lipides totaux:

La phase lipidique lavée est transférée dans des ballons de 250 ml préalablement tarés et les solvants éliminés (Evaporation au Rotavapor Buchi à 60°C , sous vide d'eau obtenu par trompe laminaire). Une deuxième évaporation avec 10 ml d'éthanol absolu permet l'élimination de l'eau résiduelle par formation d'un azéotrope éthanol-eau .

La déshydratation est achevée à température ambiante sous vide plus poussé (produit par une pompe à huile Speedvac). La quantité totale des lipides purifiés est finalement déterminée par pesée, après équilibrage thermique.

Les lipides sont ensuite remis en solution dans un mélange benzène / méthanol 2:1 (v/v), un solvant général de tous les lipides qui permet une excellente conservation sous congélation à -30°C, même pendant de longues durées .La manipulation est effectuée sous hotte compte tenu de la toxicité propre au Benzène.

IV-4 - Séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince:

La séparation des PL est réalisée par chromatographie bidimensionnelle (CCM) selon la technique décrite par (Portoukalian et al ; 1978). Les séparations sont faites sur plaque de gel de silice commerciales Merck 10*10cm (gel G sans indicateur de fluorescence, épaisseur de la couche : 0,25 mm). Ces plaques permettent de déposer jusqu'à 1 mg de lipides totaux, ce qui correspond en moyenne entre 300 et 500 microgrammes de phospholipides totaux et à 15-25 microgrammes de phosphore lipidique (P.lip) selon les types de tissus.

IV-4-1- Dépôts:

Après concentration éventuelle des lipides par évaporation sous jet d'azote, le dépôt est réalisé avec une micropipette de 10 μ L dans un angle de la plaque à 1 cm environ de chacun des bords. Il est effectué sous courant d'air tiède.

NB : La plaque étant carrée, il convient au préalable de matérialiser au crayon chacun des axes de migration.

IV-4-2- Systèmes de solvants utilisés :

La séparation optimale des divers phospholipides met en jeu 3 systèmes successifs de solvants dont la composition est résumée sur le tableau N^o 2 (page suivante). Cette procédure permet de séparer en même temps les divers phospholipides des tissus des lipides neutres (essentiellement cholestérol, triglycérides, acides gras libres, qui ne sont pas séparés les uns des autres mais se retrouvent sur une bande au front de la plaque lors de la migration dans le système acide). Cette procédure « simultanée » présente évidemment un intérêt tout particulier quand on veut comparer des cinétiques de marquage de tous les composants lipidiques d'un tissu.

Tableau 02 : Composition des systèmes de solvants utilisés pour la séparation des phospholipides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice.

Systèmes	Composition	Proportions volumes respectifs
-I- Ether diisopropylique	100%	Id (indéterminé)
-II- Mélange THF: (Tétrahydrofurane) dérivé de celui de Gray [1965]	-Tétrahydrofurane -Acétone -Méthanol -Eau désionisée	50 20 40 6
-III- Mélange acide : dérivé de celui de Rouser [1973]	-Chloroforme -Acétone -Méthanol -Acide acétique -Eau désionisée	50 20 10 15 5

Le premier système : est toujours l'éther diisopropylique seul.

Cette première migration permet de séparer les lipides neutres et les pigments (qui migrent au front) des phospholipides (qui restent au dépôt). Dans le cas d'un organe riche en Lipides Neutres (LN), il est conseillé de réaliser une migration à front perdu à fin d'améliorer la qualité de migration des PL qui peuvent être freinés par les LN.

Second système : THF (appelé ainsi car il contient du Tétrahydrofurane)

Cette seconde migration s'effectue le long d'un axe perpendiculaire au premier et elle est réalisée après séchage rapide sous jet d'air tiède des plaques issues du solvant N°= I. La migration est poussée jusqu'à environ 3-4 mm du bord supérieur de la plaque.

Troisième système : acide (appelé ainsi car il contient de l'acide acétique)

Avant passage dans le système N°= III les plaques sont placées pendant 10 min environ sous courant d'air chaud. La migration s'effectue selon le même axe que pour l'éther diisopropylique, jusqu'à 0,5 cm environ du bord supérieur.

NB : pour les déterminations de radioactivité, la migration est arrêtée plus tôt (1 cm du bord supérieur) afin de récupérer totalement les fractions correspondant aux LN.

IV-4-3- Révélation des phospholipides :

Suivant la nature des analyses à effectuer (dosage du phosphore, mesure de radioactivité après marquage) plusieurs types de révélation peuvent être employés successivement, à condition d'en respecter l'ordre car certaines respectent l'intégrité des lipides qui ont été séparés, d'autres en détruisent l'organisation.

❖ *Exposition des plaques aux vapeurs d'iode :*

C'est une technique non destructive où après contact avec une atmosphère saturée en vapeurs d'iode des plaques obtenues après migration, les différents composants lipidiques se révèlent en jaune plus ou moins intense par fixation réversible de l'Iode (I_2) sur les doubles liaisons présentes. La coloration est labile et disparaît après élimination des vapeurs d'Iode.

❖ *Réactif à la ninhydrine (Waldi, 1962) :*

Il donne une coloration pourpre caractéristique des groupements aminés libres et permet de visualiser PS, PE et leurs dérivés lyso (LPS, LPE). La coloration apparaît après quelques minutes de chauffage à 110°C et disparaît spontanément en quelques heures. Elle n'interfère pas avec le réactif suivant, ni avec le dosage chimique du phosphore. Cette technique est cependant à proscrire si un comptage de radioactivité doit être pratiqué en cas de marquage par des précurseurs tritiés (la réaction se traduit en effet par une perte de H_2O donc du marquage éventuel)

❖ *Réactif sulfo-molybdique (Dittmer et Lester, 1964) :*

Il donne une coloration bleue intense avec tous les PL par réaction du sulfomolybdène sur les groupements phosphates (création d'un complexe phosphomolybdique). La coloration des PL, immédiate à température du laboratoire, est maximale après quelques minutes. Elle s'estompe et disparaît progressivement en quelques heures. La vaporisation doit être effectuée sur plaques refroidies à température ambiante pour éviter une coloration du fond. Cette technique doit être employée après les 2 autres.

NB : Si la vaporisation du réactif est faible et rapide, cette technique permet de visualiser les phospholipides en vue de leur récupération pour la mesure de radioactivité ou pour en étudier la composition en acides gras par chromatographie gaz-liquide (voir paragraphe spécifique)

❖ *Carbonisation après révélation acide et chauffage à 150°C pendant 10 min.*

Cette technique est destructive et doit être utilisée en dernier. Elle est à proscrire pour les mesures de radioactivité après marquage avec des précurseurs tritiés et ¹⁴C. Elle permet de visualiser toutes les molécules organiques présentes sur les plaques et en particulier celles ne comportant ni phosphore, ni groupement aminé libre ou de doubles liaisons.

IV-4-4-Récupération et traitement des PL isolés

Après révélation, les tâches correspondant aux différents PL sont matérialisées. Pour le dosage du Phosphore lipidique (P.lip.) leurs surfaces sont mesurées avec une grille calibrée, ainsi qu'une portion de gel ne contenant pas de PL (blanc-gel). Cette procédure permet ainsi de corriger une éventuelle contamination par du phosphore contenu dans le gel. Les différentes tâches sont ensuite récupérées, soit dans des flacons de comptage pour évaluer leur radioactivité, soit dans des tubes à essais pour le dosage du P.lip.

IV-4-5-Dosage du phosphore lipidique total et des différents phospholipides

Cette méthode, mise au point par (Fisk et Subbarow, 1925), a été modifiée par (Abdul-Malak, 1978 ; Meister, 1980 ; Brichon, 1984). Elle est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique, en milieu sulfurique. Elle comprend deux étapes:

- la libération du phosphore lié aux lipides, par minéralisation acide.
- le dosage proprement dit du phosphore minéral.

➤ Minéralisation :

Le phosphore lipidique est libéré par chauffage en présence de 0,25 ml du mélange suivant

- * Acide sulfurique: 2vol
- * Acide Perchlorique: 1 vol
- * Tétroxyde de vanadium (catalyseur): 1g/l du mélange

L'opération est effectuée sous hotte, par chauffage pendant environ 20 secondes sur bec Mecker, jusqu'à apparition de fumées blanches abondantes.

La même procédure est utilisée pour la gamme étalon contenant 0; 3; 6; 9; 12 µg de Phosphore (solution standard de phosphate monopotassique à 6µg de P/50µl)

➤ [Dosage du phosphore:](#)

Il est effectué sur le minéralisat, directement dans les tubes, en présence de 5 ml par tube d'un réactif ANSA, préparé extemporanément.

Proportions pour 100 ml de réactif :

- Mélange ANSA (0,63 g),
- Heptamolybdate d'ammonium: (0,2 g)
- H₂O 100 ml.

Le mélange ANSA est obtenu en mélangeant au mortier :

- 60 g de métabisulfite de sodium.
- 2 g de sulfite de sodium.
- 1 g d'acide amino naphthol sulfonique.

Sous forme de poudre il se conserve plusieurs semaines au sec et à l'abri de la lumière.

Après addition de la solution et agitation au vortex, la réaction colorée se développe après 8 min de chauffage à 100°C au bain marie. L'intensité de la coloration (bleu de molybdène) est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm, soit directement sur les échantillons de lipides totaux, soit après élimination du gel par centrifugation (phospholipides séparés par CCM).

IV-4-6- Expression des résultats

[Les teneurs en Phosphore lipidique \(P.lip\)](#) sont données en µg de P.lip pour 100 mg de tissu frais. Elles serviront pour le calcul des quantités de phospholipides totaux (PL) en utilisant la relation:

$$\text{PL totaux} = \text{Phosphore lipidique total} * 27$$

Un phospholipide a un poids moléculaire moyen de : 375 g.mol⁻¹ et ne contient qu'un seul atome de phosphore (poids moléculaire de 14 g.mol⁻¹). Ainsi, la concentration des phospholipides des échantillons peut être calculée : le phosphore ne représente donc que 27^{ème} du poids d'un phospholipide.

NB: ce facteur de 27 correspond aux animaux aquatiques

[Les profils de répartition des phospholipides](#) correspondent aux proportions relatives des divers phosphatides d'un tissu, en pour-cent du phosphore lipidique total déposé. Les valeurs sont obtenues en rapportant les Densités Optiques (DO) individuelles corrigées de chaque phospholipide à la somme des DO totales corrigées.

Les DO corrigées (DOc) pour chaque phospholipide sont obtenues selon la formule:

$$\text{DOc} = \text{DO lue} - [\text{DO blanc} * (\text{surface de la tache} / \text{surface blanc gel})]$$

IV-5- Détermination de la radioactivité des divers échantillons:

Après migrations, le gel de chaque PL et des LN totaux est récupéré individuellement dans des fioles de comptage en polyéthylène. L'addition de 3 ml du mélange eau / éthanol pur (50:50 v/v) et de 8 ml de solution scintillante (Pico-fluor 40, Packard) donne après agitation vigoureuse un gel stable, translucide et parfaitement transparent au rayonnement. Cette procédure permet une bonne dispersion des particules de silice et favorise la solubilisation des lipides.

NB : *cette opération est particulièrement importante pour les échantillons marqués au tritium car le rayonnement est de faible énergie et facilement absorbé par la sédimentation du gel de silice.*

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un spectromètre β (Packard 460) équipé d'un système de correction automatique du quenching et de la chimio-luminescence (figure 13).

Le marquage de chaque fraction est exprimé en dpm et peut être rapporté en % de la radioactivité totale déposée sur la plaque.



Figure 13 : *Spectromètre β (Packard 460) utilisé pour mesurer la radioactivité.*

Les procédures employées sont plus simples lorsqu'il s'agit de compter les milieux d'incubation utilisés après addition des précurseurs (avant et après 2 ou 4 heures d'incubation en présence des tissus), les extraits lipidiques obtenus après lavage ou encore de contrôler la radioactivité des bacs de contention lors des marquages *in vivo*. Les comptages portent sur des prélèvements aliquotes de 50 à 100 microlitres des différents échantillons, après addition de 8 ml de picofluor 40 (sans ajout du mélange éthanol-eau)

NB : lors de tout travail avec des molécules marquées, le port de gants est obligatoire, tous les objets utilisés sont placés sur des plateaux garnis de filtres absorbants de même que les surfaces de travail.

IV-6- Extraction des divers lipides sur micro colonnes SPE-CL-NH₂ :

Il s'agit de micro colonnes constituées d'un corps de seringue en polypropylène contenant de la silice greffée avec une phase polaire aminopropyle.

Suivant les quantités de lipides à traiter, les colonnes utilisées contiennent 100 ou 500 mg de phase, pour un volume total des colonnes de 1 à 3 ml. Pour les colonnes de 500 mg, celles que nous avons employées, il est possible de traiter jusqu'à 5 mg de lipides totaux qui sont en solution dans 200 microlitres de chloroforme.

Toute la procédure s'effectue sous vide modéré, les colonnes étant disposées sur module d'extraction Visiprep raccordé à une trompe à vide (figure 14).

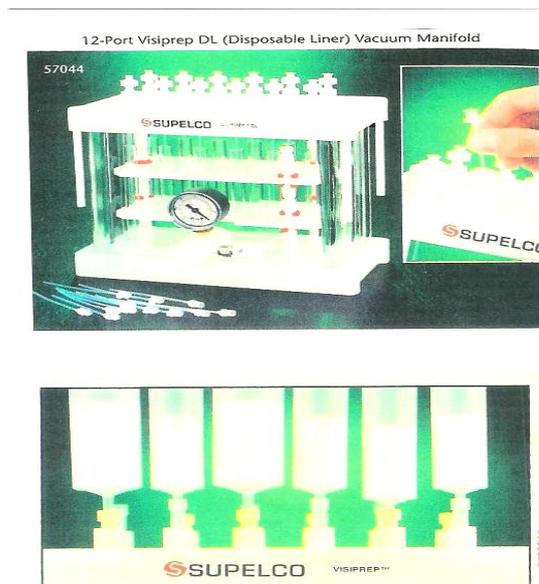


Figure 14 : système utilisé pour la séparation par chromatographie sur colonnes SPE-CL-NH₂ (Solid-phase-extraction).

➤ Protocole :

La colonne est tout d'abord lavée avec 3 ml d'hexane (activation) puis on dépose les lipides dissout dans 200 µl de chloroforme, en tête de colonne. Le cône de la micropipette utilisée est rincé successivement par 2 fois 200µl de chloroformes ajoutés sur la colonne. Toute une série de systèmes d'éluion sont ensuite employés successivement et dans un ordre défini, permettant d'entraîner avec eux, après établissement du vide, les diverses classes de composés lipidiques à séparer. Chaque fraction est récupérée dans un tube en verre de 13 ml à bouchon vissant, placé à la base de la colonne dans l'appareil.

Les fractions recueillies sont concentrées par évaporation des solvants sous azote. Le résidu est repris dans 40 µl de mélange Folch (2 :1 v/v) et conservé à moins 20°C pour contrôle et analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

➤ Solvant d'éluions

Six systèmes d'éluion ont été utilisés successivement permettant d'obtenir 6 fractions comprenant des molécules de plus en plus polaires.

-I- : Hexane / éthylacétate (85 :15 vol/vol): Les lipides neutres sont élués avec 4 ml

-II- : Chloroforme / méthanol (23 :1): Les céramides libres sont élués avec 4 ml

-III-: Acide acétique / éther isopropylique (2 :98): Les acides gras libres sont élués avec 3 ml.

-IV- : Acétone / méthanol (9 :1,35): Elue les glycolipides neutres avec 6 ml.

-V- : Folch (2:1): Elue les phospholipides neutres (PC, PE et certains phosphono- lipides) avec 5 ml (C'est dans cette fraction que se trouve la SPH quand elle existe).

-VI-: Chloroforme / méthanol / acétate d'ammonium 3,6 M (30 :60 :8): Il élue les phospholipides acides PI, PS, Diphosphatidylglycérol (DPG), Acide phosphorique (AP) les sphingolipides et certains autres phosphonolipides avec 5 ml. (Cette fraction renferme également les céramides-1-Phosphate, les sphingosines-1-P et les sulfatides, quand ils sont présents en quantité suffisante pour être détectés)

NB : le mélange d'éluion n° 6 contenant de l'acétate d'ammonium, il convient d'éliminer ce sel par lavage avec de l'eau afin d'éviter un effet « sel » (traînée) lors de la séparation par chromatographie sur couche mince permettant la purification des phosphatides ainsi élués.

Ce lavage est réalisé par ajout de 2 ml de chloroforme et 2,3 ml d'eau dans le tube. Après agitation et centrifugation 5 min à 1500 tpm, la phase supérieure hydrosoluble est éliminée par aspiration à la trompe à vide. Deux lavages successifs avec 2 ml de méthanol et 1.5 ml d'eau achèvent l'élimination de l'acétate d'ammonium, la dernière phase chloroformique étant ensuite évaporée sous azote à 40°C et le résidu repris dans 40 µl de mélange Folch (2 :1 v/v)

➤ Contrôle des fractions par chromatographie sur couche mince

(Plaque Merck gel de silice G 60, épaisseur 0,25 mm, dimensions 5 cm * 10 cm)

Le contrôle de la séparation des divers constituants dans les fractions précédemment définies s'effectue par chromatographie ascendante suivant une seule dimension (fractions I à IV), les dépôts étant effectués sur une ligne horizontale à 1 cm du bord inférieur, en présence d'étalons pour repérer les Rf.

Pour les fractions V et VI, la séparation chromatographique s'effectue en bidimension (cf. systèmes décrits précédemment mais sans passage préalable dans l'éther isopropylique).

- ✓ fraction I: lipides neutres; système: hexane / éther diisopropylique / acide acétique (80:20:1) Etalons: mélanges de lipides neutres Sigma n°= 178-1 (cholestérol libre, acide oléique libre, trioléine, acide oléique méthylé libre, cholestérol estérifié par l'acide oléique. Les diacylglycérol en 1,2 et 1,3 occupent des positions situées de part et d'autre du cholestérol libre. La révélation est faite par pulvérisation d'une solution d'acétate de cuivre à 3% dans l'acide phosphorique et chauffage 10 min à 150°C.
- ✓ fraction II: céramides et monoacylglycérols. Migration effectuée dans le système chloroforme / méthanol / acide acétique (50 :2 :2, v/v) les étalons utilisés étant les mélanges Sigma C2137 (céramides type 3 avec acides gras non hydroxylés) et C2512 (céramides type 4 avec acide gras hydroxylés) Révélation effectuée comme ci-dessus à l'acétate de cuivre.

- ✓ **fraction III:** acides gras libres (hydroxylés et non hydroxylés) Système utilisé: comme pour la fraction I: hexane / éther isopropylique / acide acétique (80 :20 :1, v/v).
Etalons : acides gras Sigma non hydroxylés (mélange palmitate, oléate, linoléate) et hydroxylés. Révélation par acétate de cuivre à 150°C.
- ✓ **fraction IV:** sphingoglycolipides : Etalons Sigma céramides monohexosides: CMH (C4905) dihexosides: CDH (C3166), trihexosides: CTH, gangliosides (G3018).
Système: chloroforme / méthanol / eau (65 :25 :4, v/v). Révélation par calcination après pulvérisation acide.

NB : les analyses des fractions I à IV n'ont été faites qu'à titre de contrôles afin de vérifier qu'au cours de la procédure de fractionnement il n'y avait pas entraînement des phospholipides PE, PC et des phosphonolipides dans ces fractions.

- ✓ **fractions V et VI:** contrôle effectué par CCM bidimensionnelle dans le même système que pour les phospholipides totaux (1^{er} migration solvant THF, 2^{ème} migration solvant « acide »).

Dans le but d'essayer de caractériser les fractions obtenues, il a été effectué en parallèle une séparation bidimensionnelle sur l'extrait des fractions V et VI avant saponification et après saponification douce. Ce traitement rompt les liaisons esters et détruit les glycérophospholipides alors qu'il respecte les liaisons amides reliant les acides gras des sphingolipides aux bases sphingoïdes.

NB : Pour en effectuer l'analyse des acides gras par chromatographie gaz-liquide , des quantités plus importantes de PC purifiées ont été obtenues par CCM en monodimension dans le système : chloroforme / méthanol / acide acétique / eau (40 :10 :10 :1).

IV-7 Analyse des acides gras constitutifs des PC purifiées :

Cette analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse sur de la PC extraite des différents tissus (hémolymphes, glande digestive, branchie, manteau) et purifiée par chromatographie sur colonne LC-NH₂ suivie d'une purification supplémentaire de la fraction V par chromatographie sur couche mince.

IV-7-1- Transméthylation par méthanolyse

Cette opération consiste à couper la liaison ester unissant les acides gras au groupement glycérol de la PC, les acides gras ainsi libérés subissant en même temps une dérivatisation par fixation d'un groupement méthyle en début de chaîne permettant de diminuer leur liaison avec la phase stationnaire de la colonne de chromatographie. Ces 2 opérations s'effectuent directement sur le gel de silice où est adsorbée la PC à l'issue de la purification par CCM, sans élution préalable. (La fraction correspondante étant récupérée par grattage du gel sur la plaque il n'y a pas de risque de perte d'espèces moléculaires particulières des phospholipides comme cela peut être le cas lorsqu'il faut le désorber du gel par élution avec des systèmes de solvants, la récupération n'étant pas toujours totale).

Les acides gras de la PC sont libérés par méthanolyse acide en présence de chlorure d'acétyle en solution 0,5 M dans du méthanol anhydre. La réaction est totale après 1 heure à 90°C, les acides gras libérés subissant en même temps la méthylation. Toute la réaction s'effectue en tubes bouchés (bouchon vissant téflonné) maintenus à l'étuve. La quantité optimale de solution de méthylation est de 1 ml pour 0,5 mg de lipides.

NB : toute l'opération devant s'effectuer en milieu anhydre, il est nécessaire d'ajouter sur le gel contenant la PC un volume de 0,5 ml du mélange Benzène / Chlorure d'acétyle pur en proportions 60 :30 afin de piéger l'eau éventuellement fixée sur le gel de silice.

Après refroidissement, les acides gras méthylés sont extraits par 3 fois 3 ml d'hexane de grade « pour HPLC » disposés dans un tube de verre de 15 ml. L'excès d'acide est éliminé par ajout de 3 ml d'eau distillée et élimination de la phase aqueuse inférieure après agitation vigoureuse et centrifugation. L'opération de lavage est répétée 2 fois et la dernière phase hexanique (phase supérieure) contenant les acides gras méthylés est délivrée dans un tube à bouchon vissant pour éliminer le solvant et les traces d'eau sous jet d'azote tiède. L'opération est achevée par passage sous vide d'huile (pompe speedvac) pour éliminer toutes traces d'eau et le résidu sec (acides gras méthylés) est remis en solution dans 40 microlitres d'hexane pur en vue de l'utilisation pour la GLC. Cette solution se conserve quelques jours à -30°C.

IV-7-2-Analyse des acides gras par chromatographie gaz liquide (GLC) :

Le chromatographe utilisé (CHROMPACK CP 9000) est équipé d'une colonne capillaire de silice (longueur 30 mètres, diamètre intérieur 0,25 mm) de type Omegawax 250 spécialement adaptée à la séparation des acides gras méthylés, en particulier des familles oméga 6 et oméga 3 (figure 15). La phase stationnaire est une phase greffée moyennement polaire de poly (éthylèneglycol) capable de fonctionner de manière hautement reproductible entre 50 et 280°C. L'injecteur split-splitless et le détecteur à ionisation de flamme (FID) sont maintenus à 260 °C, l'analyse étant effectuée en programmation de température multi rampes (la colonne étant contenue dans un four dont on fait varier la température depuis 180°C jusqu'à 240°C)



Figure 15: Chromatographie gaz liquide (GLC) utilisé pour analyser des acides gras

❖ Conditions d'analyse :

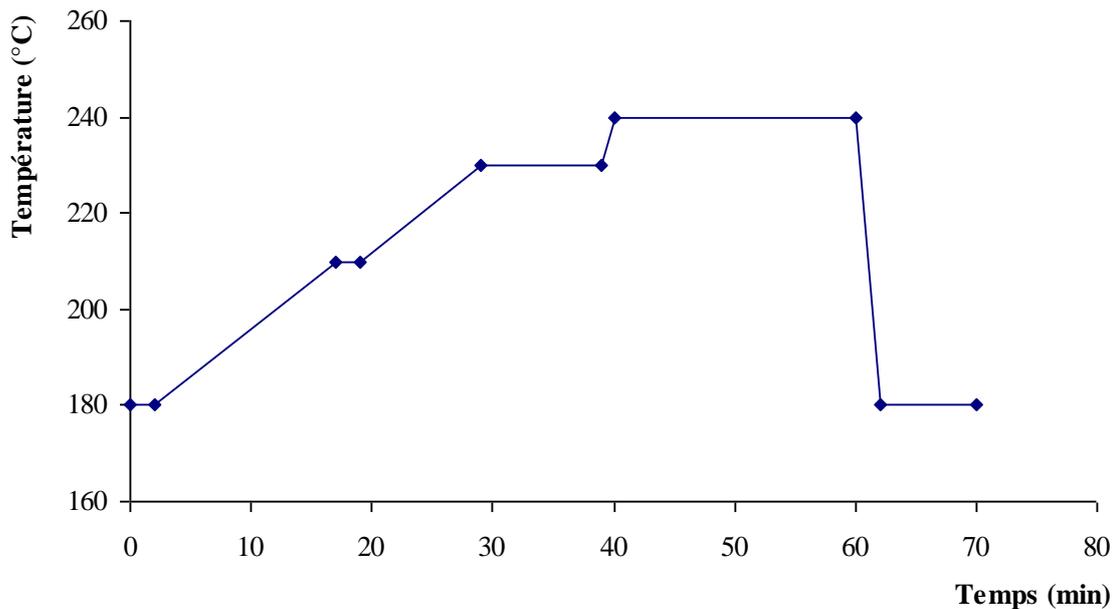
- gaz vecteur : Azote pur (grade 5.0), make up-gas : Azote
- flamme du détecteur alimentée par Hydrogène pur et mélange Oxygène / Azote K.
- pression de l'azote en tête de colonne : 65 KPa, débits d'air et d'hydrogène respectivement de 300 et 25-30 ml/min.

❖ Programmation de la température du four:

Température initiale : 180°C, isotherme durant 2 min. puis incrémentation de 2°C/min jusqu'à 210°C et isotherme 2min. Nouvelle incrémentation de 2°C/min jusqu'à 230 °C puis isotherme 10 min. En fin d'analyse, incrément de 10°C/min jusqu'à 240 °C, pendant 20 min

(ceci permet de purger la colonne de composés résiduels de grande masse ou cyclisés comme des stérols) puis retour à la température initiale de 180°C (figure 16). Les acides gras sont repérés par leur temps d'apparition (rétention) au niveau de la flamme du détecteur, par comparaison avec ceux d'acides gras étalons traités de manière identique.

*Figure 16: Analyse des acides gras par GLC
Programmation de température multirampe*



❖ Standards utilisés :

Mélanges d'acides gras méthylés répertoriés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, ou mélanges d'acides gras purs :

- * PUFA I (marine source) Supelco n° 47033 et PUFA 3 (menhaden oil) Supelco n°47085-U
- * GC 90 (acides gras à nombre impair de carbone: C 13 à C 21)
- * mélange NHI / NIH, standards quantitatifs pour tester les facteurs de réponses de détection
- * mélange Supelco 18919-1AMP de 37 acides gras méthylés.

❖ Intégration :

Le détecteur est couplé à un intégrateur muni du logiciel Maestro qui permet de mesurer l'importance relative des pics donnée en % du total des pics obtenus.

V - EXPRESSION DES RÉSULTATS ET STATISTIQUES UTILISÉES:

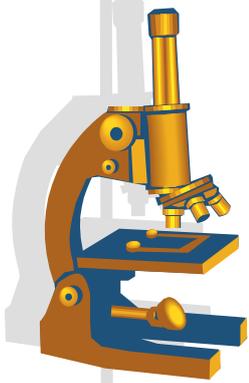
Les données concernant les compositions en lipides totaux, phospholipides et lipides neutres totaux sont exprimées en mg pour 100 mg de tissu frais.

Les quantités relatives des divers lipides neutres sont exprimées en pour cent des lipides neutres totaux et celles des lipides phosphorés en pourcentage du phosphore lipidique total déposé sur les plaques.

Les données relatives aux marquages par les précurseurs radioactifs sont données en désintégrations par minutes (dpm), après correction du quenching (fait automatiquement par l'appareil). Les radioactivités spécifiques sont exprimées en dpm / micromole de PL, les profils de marquage étant exprimés en dpm pour cent des dpm totales déposées sur la plaque.

Toutes les valeurs présentées dans les tableaux, les histogrammes et les graphes correspondent aux moyennes obtenues sur plusieurs animaux ou essais par tissu. Elles sont accompagnées de leur erreur standard (\pm SEM).

Les moyennes sont comparées par analyse de variance et test de Student au seuil 5%. Pour les données exprimées en pourcentages, l'analyse des moyennes est effectuée après transformation en arc sinus des données.



RESULTATS

RESULTATS

I- Teneurs en lipides totaux, phospholipides et lipides neutres des différents tissus

Les figures 17, 18 et 19 donnent les teneurs des lipides totaux (LT), des phospholipides totaux (PL) et les lipides neutres totaux (LN) exprimés en mg pour cent mg de tissu frais de la moule *Mytilus Galloprovincialis*.

Figure 17: Teneur en lipides totaux des principaux tissus, en mg %mg poids frais

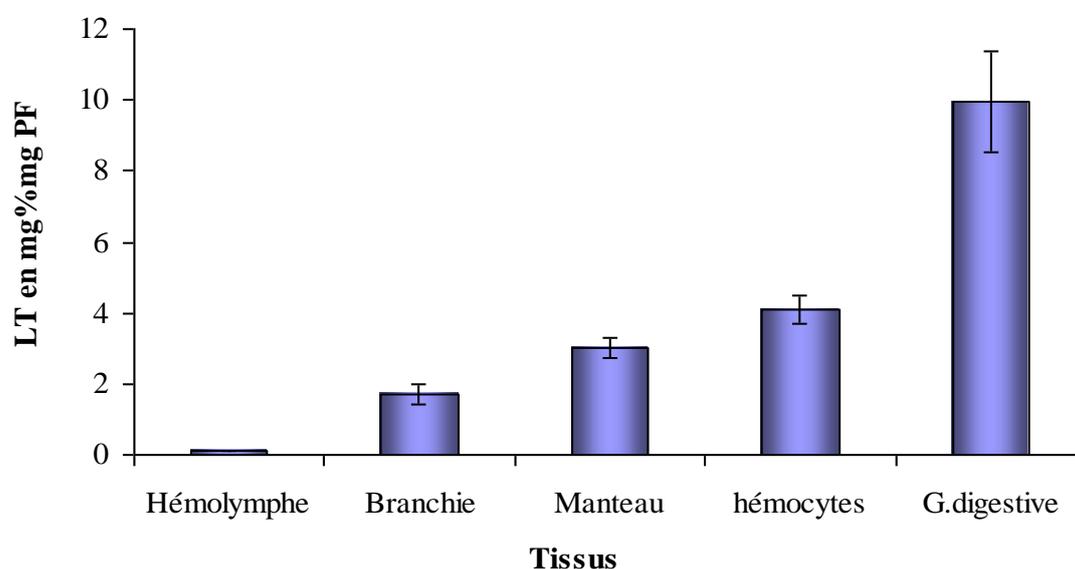


Figure 18: Teneur en phospholipides totaux des principaux tissus, en mg %mg de poids frais.

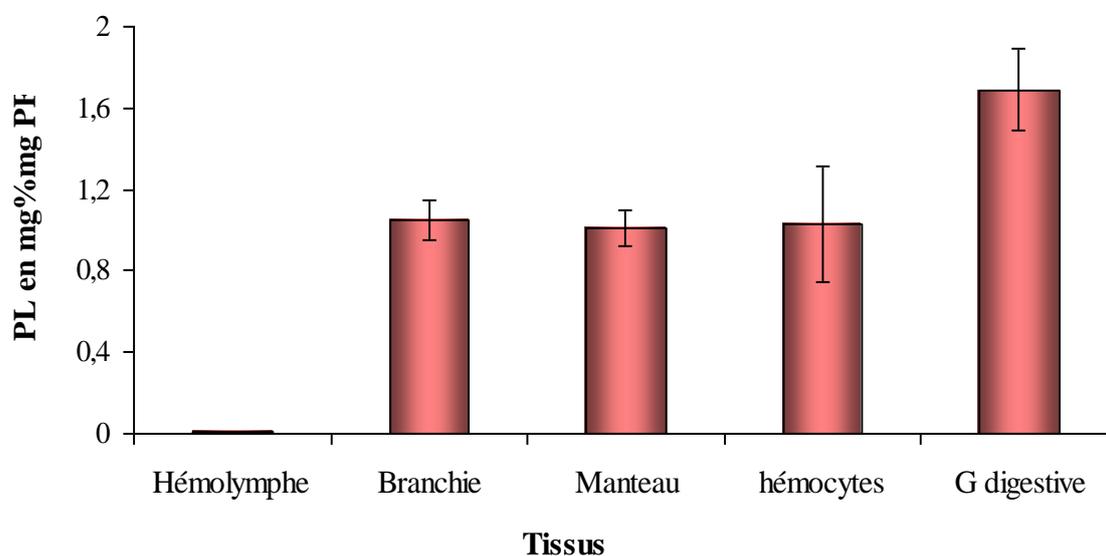
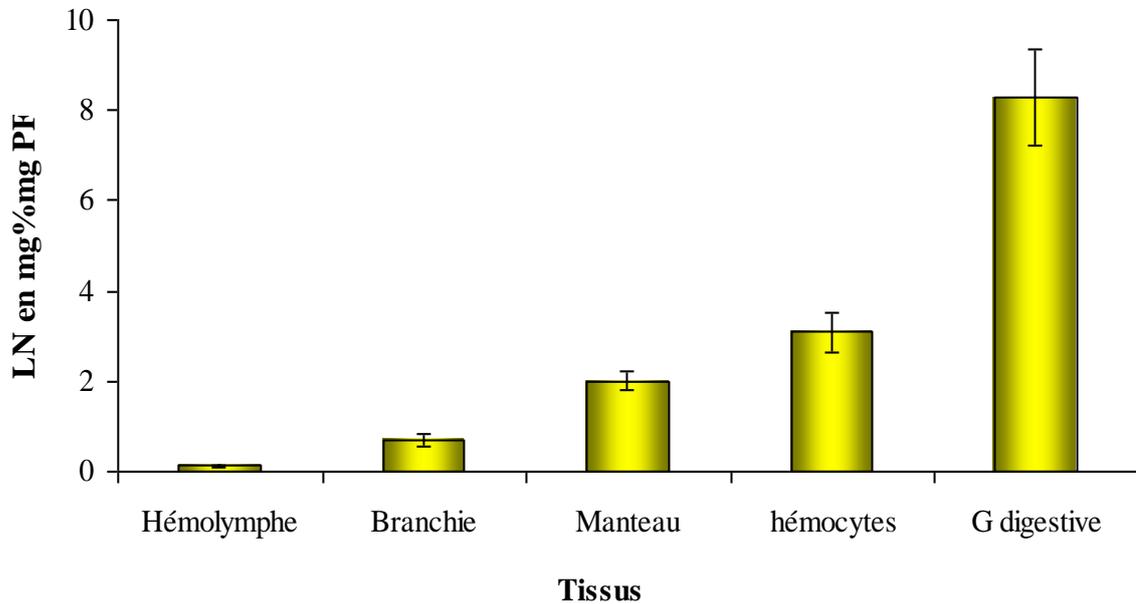


Figure 19: Teneur en lipides neutres des principaux tissus, en mg/mg de poids frais

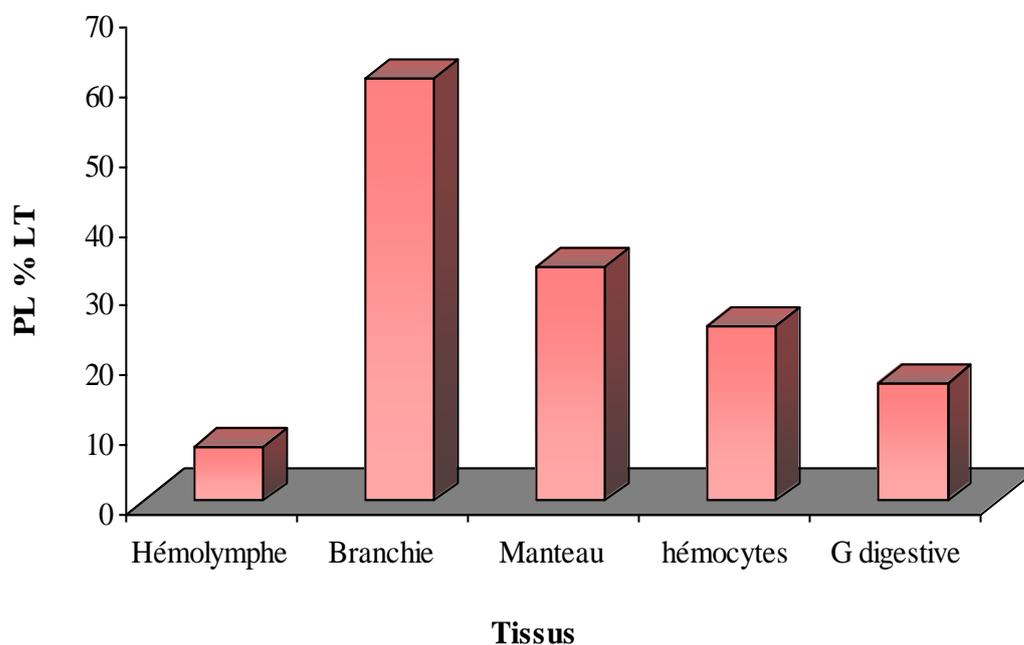


La figure 17 permet de voir que la glande digestive, les hémocytes puis le manteau sont les compartiments les plus riches en lipides totaux, l'héolymph étant le plus pauvre.

La conversion du phosphore lipidique en phospholipides totaux (figure 18) montre que, dans la branchie le manteau et les hémocytes les valeurs exprimées en mg pour cent mg de tissu restent très comparables alors que celles dans l'héolymph sont très faibles. Les teneurs les plus élevées se retrouvent là encore dans la glande digestive.

Les lipides neutres totaux déduits des lipides totaux par soustraction des phospholipides (PL), les valeurs obtenues (figure 19) montrent clairement que la glande digestive et les hémocytes sont les tissus les plus riches en lipides neutres que celles de manteau et la branchie, l'héolymph représente les valeurs les plus faibles.

Figure 20: Les valeurs en PL exprimées en pour cents des LT



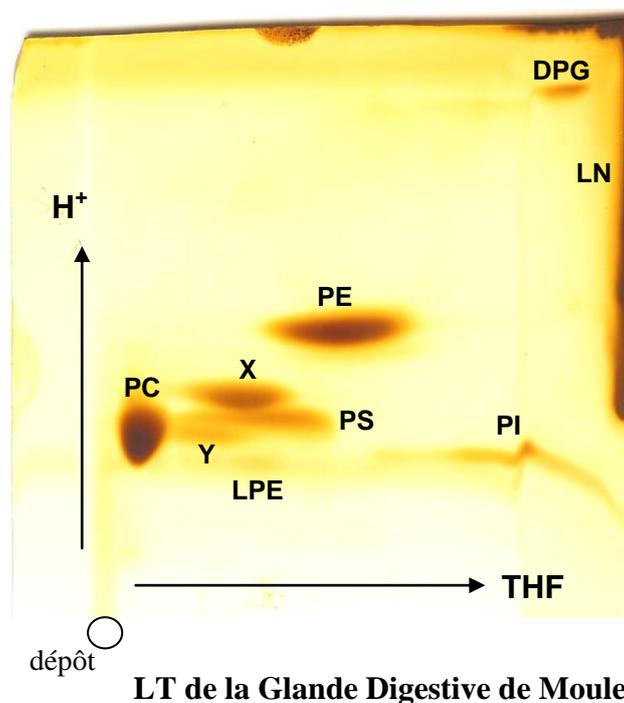
Exprimées en pour cent des lipides totaux, les valeurs en phospholipides (figure 20) sont très élevés dans la branchie organe essentiellement constitué de cellules et donc riche en membranes, alors qu'elles sont très faibles dans l'hémolymphe, ce compartiment étant dépourvu de ses cellules qui ont été éliminées par centrifugation.

Un point intéressant concerne les hémocytes (cellules circulantes), qui semblent particulièrement riche en lipides neutres (LN) qui représentent 75% de leur charge lipidique, valeur assez voisine de celle trouvée pour la glande digestive.

II- Profils de répartition des diverses fractions lipidiques dans les tissus

On a pris à titre d'exemple le profil de répartition de diverses fractions lipidiques de la glande digestive, les autres tissus ayant le même profil de répartition.

Figure 21 : CCM à deux dimensions des LT de la G. digestive après révélation par l'Iode.



X et Y sont deux composants révélés positivement avec la ninhydrine et Dittmer & Lester. Ils contiennent donc à la fois un groupement aminé libre (ninhydrine +) et un groupement phosphate (Dittmer & Lester +). Après pulvérisation de réactif Dittmer & Lester et carbonisation, la couleur bleue du phosphomolybdate réapparaît pour ces deux composés indiquant que ces deux fractions comportent au moins en partie des phospholipides.

LN : ensemble de tout les lipides neutres.

PC : Phosphatidylcholine.

PE : Phosphatidyléthanolamine.

PS : Phosphatidylsérine.

PI : Phosphatidylinositol.

LPE : Lysophosphatidyléthanolamine.

DPG : Diphosphatidylglcérol ou cardioline.

H^+ et THF sont les deux axes de migration : H^+ dans le système acide et THF dans le système basique.

La séparation chromatographique sur couche mince des extraits de lipides totaux et le dosage des différents phospholipides permettent de voir que comme dans les tissus des poissons, crustacés ou mammifères, les espèces dominantes de phospholipides sont la Phosphatidylcholine (PC) et la Phosphatidyléthanolamine (PE), alors que la PS (Phosphatidylsérine), le Phosphatidylinositol (PI) et le Diphosphatidylglycérol (DPG) sont minoritaires ainsi que la Lysophosphatidylcholine (LPC), sauf dans l'hémolymphe.

Ces analyses confirment l'absence de sphingomyéline (SPH) dans tous les tissus analysés ainsi que l'apparition de quelques composés qui n'existent apparemment pas chez les organismes situés phylogénétiquement au-dessus des mollusques bivalves.

Ces constituants, indiqués X et Y, encadrent la PS dans le système de séparation bidimensionnel utilisé. Ils sont révélables par pulvérisation de réactif à la ninhydrine, ils ont donc au moins une fonction aminée libre. Révélés en bleu (bleu de molybdène) après pulvérisation de réactif de Dittmer et Lester, ils appartiennent donc au groupe des phospholipides. Enfin, après carbonisation à 100°C et refroidissement de la plaque, les spots correspondant à X et Y redeviennent bleus alors que toutes les autres tâches restent gris noir. Cette dernière réaction laisse supposer que ces fractions X et Y comportent au moins en partie des composés appartenant au groupe des phosphonolipides (liaison directe -C-P- et non -CO-P- comme dans le cas des phospholipides)

Une analyse par spectrométrie de masse est actuellement en cours dans un laboratoire spécialisé pour caractériser ces fractions X et Y, mais les résultats ne sont pas encore disponibles. Il semblerait toutefois que la fraction Y pourrait comporter au moins un composé amino éthylphosphonate, car lors des expériences menées avec l'Éthanolamine tritiée on retrouve une incorporation de radioactivité significative dans cette fraction Y.

Tableau 03 : Répartitions des phospholipides dans les principaux tissus et organes de la moule *Mytilus Galloprovincialis*.

Phospholipides	Branchie	Manteau	Gl. Digestive	Hémolymphe	Hémocytes
<u>Phosphonolipides</u>	pour cent de phosphore lipidique				
X	1.0 ± 0.7	1.3 ± 0.6	1.5 ± 0.7	0.7 ± 0.5	1.9 ± 0.8
Y	9.3 ± 0.6	7.8 ± 0.2	5.7 ± 0.3*	10.9 ± 4.7	13.4 ± 4.5 #
<u>Phospholipides</u>					
LPC	2.7 ± 0.6	traces	3.2 ± 0.2	11.9 ± 3.7 α	4.1 ± 2.3
PC	38.0 ± 1.5	42.3 ± 2.8	49.2 ± 1.1*	41.4 ± 6.9	34.9 ± 6.9 #
PS	3.7 ± 1.0	7.4 ± 1.1	2.7 ± 0.8**	5.9 ± 2.3	8.0 ± 3.7 #
PI	5.9 ± 0.6	6.8 ± 0.6	7.0 ± 0.9	4.4 ± 1.9	2.3 ± 1.3 #
PE	37.2 ± 0.2	31.9 ± 1.6	22.1 ± 1.9**	24.5 ± 5.3	28.6 ± 7.2
DPG	2.2 ± 1.3	4.2 ± 0.6	6.4 ± 1.8	-	5.2 ± 3.4

Ce tableau permet de voir les profils de répartition des phospholipides (Valeurs moyennes exprimées en pour-cent du phosphore lipidique total déposé sur les plaques).

Différence significative $p < 0.05$ entre glande digestive et branchies *, entre glande digestive et manteau **, entre glande digestive et hémocytes #, entre glande digestive et hémolymphe α.

Moyennes de 10 animaux pour branchie, glande digestive et manteau, et moyennes de 5 pools de 20 moules chacun pour hémocytes et hémolymphe.

Dans tous les tissus, le composé Y est très largement dominant par rapport à X. Si aucune différence statistiquement significative n'existe entre les divers tissus pour X, le composé Y est statistiquement plus abondant dans la branchie que dans la glande digestive. Les valeurs trouvées dans l'hémolymphe et les hémocytes restent à hauteur de celles de la branchie et du manteau, et nettement supérieures à celles de la glande digestive (différence toutefois non significative du fait d'une dispersion plus élevée compte tenu du faible nombre de mesures).

En ce qui concerne les phospholipides, la PC est l'espèce dominante (de 38 à 49% de l'ensemble des phospholipides) avec une différence significative entre la glande digestive, les hémocytes et la branchie. Dans les autres tissus, les pourcentages de PC restent très comparables.

La PE est le second phospholipide de par son abondance (22 à 37%). Les pourcentages en PE sont très semblables à ceux de la PC dans la branchie et assez voisins dans le manteau et les hémocytes (rapport PC / PE respectivement de 1,0 ; 1,3 et 1,2). Dans les autres tissus la valeur de la PE est systématiquement inférieure à celle de la PC (rapports PC / PE de 2.2 et 1.7 respectivement dans la glande digestive et l'hémolymphe)

En ce qui concerne les autres phospholipides :

- la PS est significativement moins représentée dans la branchie et la glande digestive que dans les autres tissus : manteau et hémocytes, hémolymphe (la différence n'étant pas significative dans cette dernière).
- Le PI reste très voisin dans tous les tissus sauf les hémocytes où son pourcentage est significativement inférieur à celui dans la glande digestive.
- Les pourcentages en DPG restent globalement voisins entre tous les tissus, exception faite pour l'hémolymphe où ce phospholipide est absent (rappelons qu'il est connu pour exister seulement dans la membrane interne des mitochondries)
- La LPC n'est observée qu'à l'état de traces dans le manteau (mais cet organe supportant la gonade peut être sujet à de très fortes variations de composition suivant le cycle sexuel du mollusque). Les teneurs restent voisines dans la branchie, les hémocytes et la glande digestive alors qu'elles dépassent 11% dans l'hémolymphe.

Par fractionnement sur colonne SPE-LC-NH₂, on obtient dans la fraction VI les phospholipides acides (PS, PI, DPG) ainsi que les composés X et Y. Après pulvérisation du réactif Dittmer et Lester et carbonisation, les tâches correspondant à X et Y redeviennent progressivement bleues, tous les autres composants organiques restant gris noir

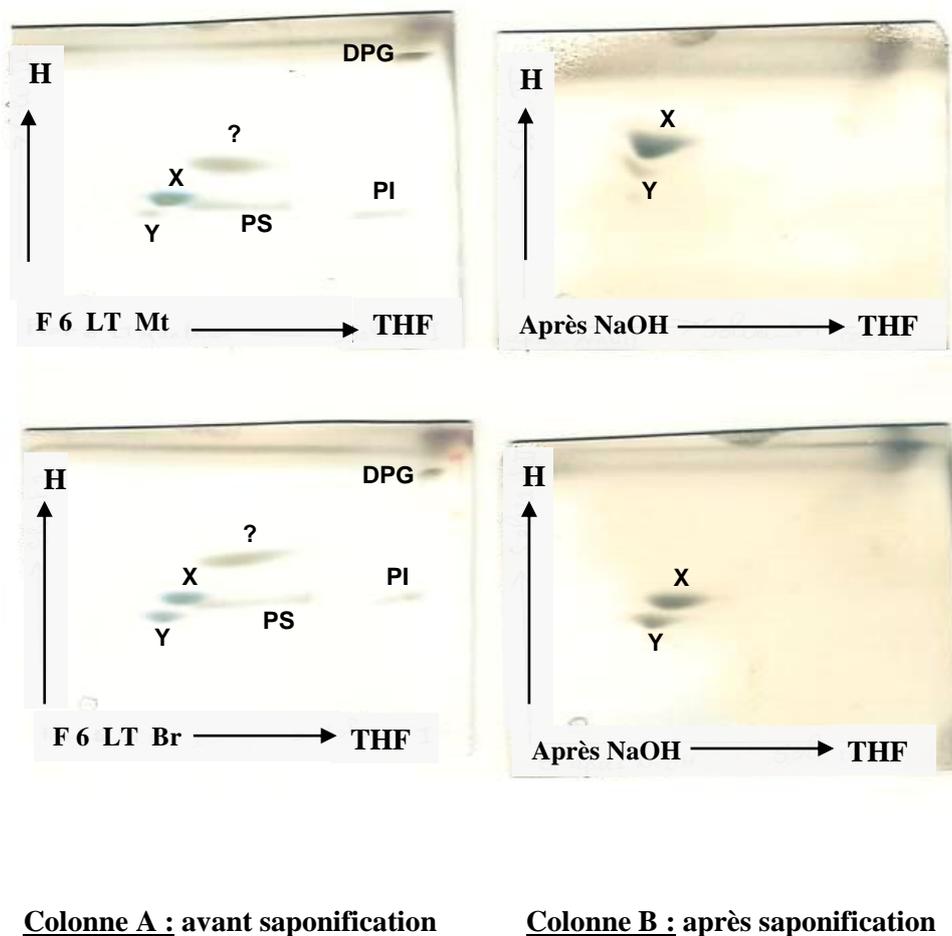


Figure 22: CCM à deux dimensions de la fraction VI de lipides de manteau (Mt) et branchie (Br) après fractionnement sur LC-NH₂, avant et après saponification douce par NaOH.

La colonne A montre les plaques obtenues avec la fraction VI (qui contient des phospholipides acides et les composés X et Y) de manteau et de branchie. Avant saponification on retrouve les phospholipides PS, PI, DPG ainsi que des tâches X et Y ces dernières redevant bleues après refroidissement (colonne A).

Après saponification douce, colonne B, il y a disparition des spots correspondant à PS, PI et DPG (puisque le traitement par NaOH rompt les liaisons esters et détruit les glycérophospholipides) et seules demeurent les tâches correspondant aux fractions X et Y (ces composés sont caractérisés par une liaison directe –C-P qui n'est pas hydrolysé par NaOH). Ce résultat confirme, au moins en partie, la nature phosphonolipide de ces composants.

III- Etudes des les lipides neutres totaux :

Par CCM monodimension d'extraits de LT dans le système Hexane / Ether isopropylique / Acide acétique (80 :20 :1) précédemment décrit, une quantification relative des diverses catégories de lipides neutres a été pratiquée. La plaque est révélée par carbonisation après pulvérisation du mélange acétate de cuivre / acide phosphorique et les fractions quantifiées par densitométrie (scanner CS 220 Shimadzu). Cette procédure permet de voir que les lipides neutres dominants sont les triacylglycérols, le cholestérol libre et estérifié et des hydrocarbures; les diacylglycérols restent minoritaires. On observe également des traces d'acides gras méthylés (confondus aussi avec des alcools gras) ainsi que quelques constituants non identifiés (de l'ordre de 1% des LN totaux).

Tableau 04 : Proportions relatives des diverses catégories de lipides neutres.

	Branchie	Manteau	Gl. Digestive
Hydrocarbures	13.0	1.1	4.7
Cholestérol estérifié	4.1	6.6	2.9
Triglycérides	17.9 ± 2.4	70.9 ± 2.9*	69.7 ± 4.3*
Cholestérols libres	61.8 ± 1.2	18.3 ± 0.9*	19.3 ± 0.5*
Diglycérides	2.0	2.2	2.4
Non identifiés	1.2	0.9	1.0

Le tableau n°4 donne les valeurs relatives obtenues (exprimées en pour-cent des lipides neutres totaux) pour la branchie, le manteau et la glande digestive, l'analyse dans l'hémolymphe et les hémocytes n'ayant pu être réalisée à cause des trop faibles quantités de lipides disponibles.

* différences significatives au seuil de 5% par rapport aux valeurs trouvées dans la branchie.

Les pourcentages en esters de cholestérol restent assez voisins entre les 3 tissus, de même en ce qui concerne les diacylglycérols.

La proportion relativement importante d'hydrocarbures retrouvés dans la branchie pourrait peut-être provenir d'une contamination par l'environnement et liée au rôle filtreur de cet organe qui est muni de cils vibratiles sur toute sa surface. Seule une analyse par GC-MS de cette fraction permettra de connaître la nature exacte des hydrocarbures présents.

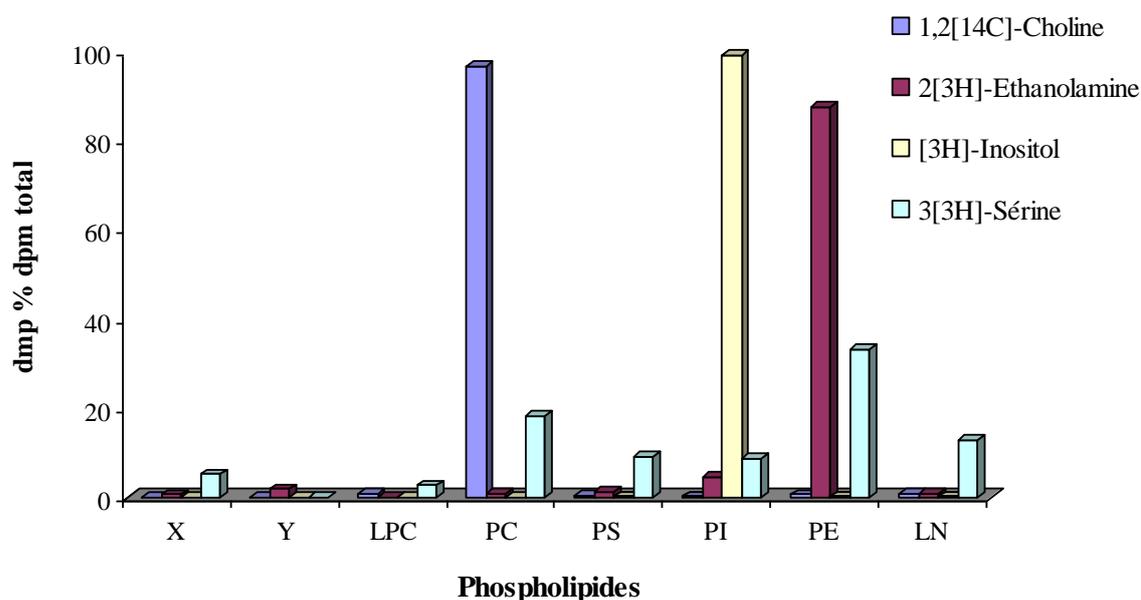
Entre la branchie d'une part, le manteau et la glande digestive d'autre part, on assiste à une inversion totale entre les proportions de cholestérols libres et de triacylglycérols (TG), la différence étant significative. Les fortes teneurs en TG dans ces 2 derniers tissus sont à mettre au compte de leur rôle dans la fourniture énergétique : pour les gamètes dans le manteau et vers tous les tissus pour la glande digestive.

IV- Etude *in vitro* des capacités des tissus à synthétiser leurs phospholipides

IV-1- Résultats préliminaires au niveau du manteau

Une étude conduite au laboratoire par (Lubet et al. 1985) avait montré qu'après 3 heures d'incubation à 17°C en présence de précurseurs radioactifs (Choline, Ethanolamine, Inositol et Sérine) le manteau de la moule *M. Galloprovincialis* possédait les capacités à synthétiser ses principaux phospholipides.

Figure 23: Distribution de la radioactivité dans les PL, LN et phospholipides après incubation *in vitro* du manteau



200 à 400 mg du manteau de la moule *M. Galloprovincialis* a été incubé dans 5 ml de l'eau de mer à 17°C pendant 3 heures en présence 1µCi/ml de 1,2[¹⁴C]-choline, 5µCi/ml de 2[³H]-éthanolamine, 5µCi/ml de [³H]-inositol ou 3[³H]-sérine. La distribution de la radioactivité est exprimée en dpm pour cent de la radioactivité totale mesurée sur les plaques.

De cette étude préliminaire, il ressort que le manteau semble bien capable de produire la PC selon sa voie de synthèse directe (incorporation de la **choline*** dans la CDP-Choline) ainsi que le PI à partir de l'**inositol***.

Avec l'**Ethanolamine***, ce précurseur s'incorpore effectivement d'abord dans la PE (à 88%) mais également dans le composé Y, confirmant qu'il pourrait bien s'agir d'un amino-éthylphosphonate. La présence du traceur au niveau du PI montre qu'il pourrait y avoir contamination du PI par un autre composé contenant de l'éthanolamine comme par exemple un glycolipide ou des intermédiaires de méthylation de la PE. (Comme la mono ou la diméthyl-PE) cette hypothèse étant confortée par le marquage de la PC

Avec la **sérine***, on retrouve du marquage dans la PS et la PE (traduisant une forte capacité de décarboxylation de la copule sérine fixée sur la PS) ainsi que dans la PC et la LPC. Ces résultats traduisent l'existence d'une capacité significative de ce tissu à produire de la PE par décarboxylation de la sérine fixée à la PS et confortent l'hypothèse d'une voie indirecte de production de la PC par méthylation de la PE. On retrouve enfin un marquage très significatif des LN, indiquant la capacité de ce tissu à utiliser la sérine pour produire le squelette glycérol des glycérolipides.

La présence d'un marquage conséquent au niveau de la fraction X mais absent dans la fraction Y, apporte 2 compléments d'information intéressants :

- Y serait un phosphonolipide contenant une fonction aminée libre mais pouvant aussi être organisé à partir d'une base sphingoïde comme la sphingosine. Ce serait un sphingo-phosphonolipide, le temps de marquage (incubation) choisi restant toutefois trop court pour avoir une synthèse significative de base sphingoïde à partir de la sérine.
- X comprendrait au moins en partie un composé de type glycérophosphonolipide comprenant également un composé aminé dont la fonction amine ne serait pas masquée (puisque révélable par la ninhydrine)

Un point intéressant concerne la PC et la PE, les 2 phospholipides majoritaires dont le métabolisme paraît intriqué dans le manteau de la moule comme cela a été montré dans divers tissus des Crustacés et des Poissons (Abdul-Malak 1978 ; Chapelle et al.1982; Brichon 1984). Il importe donc de confirmer l'existence ou non de cette voie indirecte dans d'autres tissus de la moule.

IV-2- Incorporation *in vitro* de 2-[³H] - Ethanolamine dans les tissus principaux :

Ont été retenus pour cette étude les branchies, la glande digestive, le manteau, le muscle adducteur postérieur et les hémocytes circulants (obtenus par centrifugation de l'hémolymphe). Ces tissus ont été incubés à 20°C pendant 3 heures dans 5 ml de l'eau de mer stérile avec 100 µCi de 2-[³H]-Ethanolamine.

Tableau 05 : Distribution du marquage de la 2-[³H]-éthanolamine entre les lipides neutres, les phospholipides et les phosphonolipides de différents tissus de la moule *Mytilus Galloprovincialis*.

	G. Digestive	Manteau	Branchie	Muscle	Hémocytes
Phosphonolipides					
X	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Y	2.2 ± 0.3	2.6 ± 0.3	3.3 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Phospholipides					
LPC	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1	0.5 ± 0.2	2.3 ± 0.5
PC	2.8 ± 0.6 *	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.1 ± 0.4 *	5.5 ± 1.1*
PS	0.6 ± 0.8	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	2.1 ± 0.6
PI	1.3 ± 0.6	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2
PE	87.4 ± 1.1	90.7 ± 1.8	90.4 ± 1.1	88.3 ± 0.5	50.1 ± 0.1
Lipides Neutres	3.0 ± 0.8	4.6 ± 0.5	3.2 ± 0.6	7.0 ± 0.4	32.8 ± 0.7

La distribution du marquage étant donnée en dpm pour cent de la radioactivité totale mesurée sur les plaques.

* indique la présence de choline marquée retrouvée après acétolyse de la PC

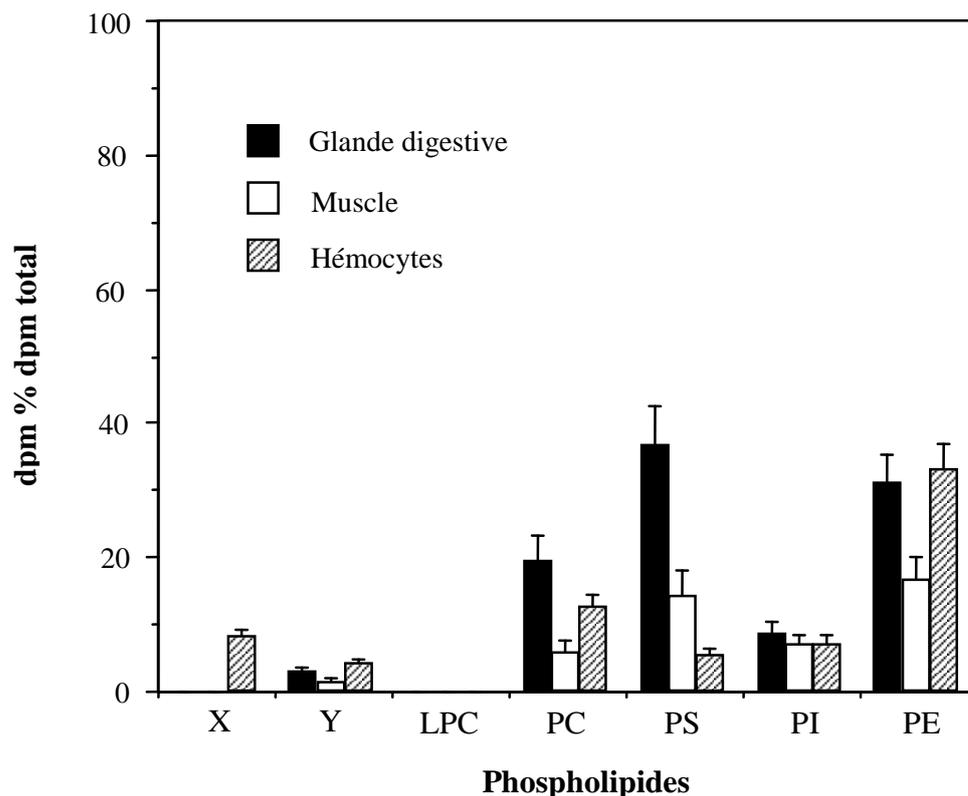
Ce tableau montre que :

- dans tous les tissus sauf les hémocytes circulants, le marquage de l'éthanolamine se retrouve entre 87 et 91% dans la PE.
- dans tous les tissus, sauf les hémocytes, la glande digestive et le muscle le marquage de la PC reste inférieur à 0.6%, indiquant que la production de PC par N-méthylation de la PE est certainement un phénomène très limité dans ces tissus.
- dans tous les tissus sauf le muscle et les hémocytes, l'incorporation du marquage de l'éthanolamine ne se produit que dans la fraction Y des phosphonolipides (2 à 3% des dpm des LT). Par contre, dans le muscle et les hémocytes, le marquage dans Y est très faible et de l'ordre de grandeur de celui observé dans la fraction X de tous les tissus (0.2 - 0,4% des dpm des LT)
- seuls les hémocytes présentent une radioactivité marquée dans les lipides neutres (33% de la radioactivité mesurée dans les lipides totaux contre 3 à 7 % pour tous les autres tissus)
- seuls le muscle, la glande digestive et surtout les hémocytes circulants présentent une incorporation notable de la radioactivité de l'éthanolamine dans la PC (2.1%, 2.8% et 5.5% respectivement). L'acétolyse de la PE et de la PC (technique de Hasegawa et Suzuki 1976) confirme que la radioactivité se trouve dans les copules éthanolamine de la PE et choline de la PC et non dans le groupement diacylglycérol.

IV-3- Incorporation *in vitro* en présence de 3-[³H]-L-Sérine

Comme pour l’Ethanolamine, le marqueur (100 µCi) a été dissous dans 5 ml d’eau de mer filtrée à 0.22 µm, les tissus (glande digestive, muscle et hémocytes) étant incubés pendant 3 heures à 20°C sous agitation permanente.

Figure 24 : Distribution *in vitro* de la 3-[³H]-L-Sérine dans les phospholipides et les phosphonolipides.



La figure n°= 24 : donne la distribution *in vitro* de la radioactivité de la 3-[³H]-L-Sérine dans les phospholipide et les phosphonolipides de 3 tissus : glande digestive, muscle et hémocytes de la moule *M. galloprovincialis*, après 3heures d’incubation à 20°C

La répartition de la radioactivité est exprimée en pour cent de la radioactivité totale récupérée sur la plaque.

La figure 24 montre que :

➤ Dans la glande digestive :

La sérine s’incorpore d’abord dans la PS puis dans la PE et la PC successivement .Une réaction de décarboxylation de la PS en PE et une production de PC par méthylation de la PE

est particulièrement intense dans la glande digestive, cette voie indirecte de la synthèse de la PC par méthylation de la PE semble donc bien être confirmée dans ce tissu.

Les radioactivités mesurées dans ces 3 phospholipides peuvent également relever d'une entrée du squelette de la sérine dans leur moitié glycérol (comme observé au niveau du PI)

➤ Dans les hémocytes :

Le marquage de la PS devient plus faible que dans la PE indiquant que le processus de décarboxylation de la PS en PE est très important puisque 33% du marquage des LT se retrouve dans la PE contre 5,6% seulement dans la PS, la production de PC par N-méthylation de la PE paraissant aussi importante dans les hémocytes de la moule.

➤ Dans le muscle :

On retrouve du marquage dans la PS et PE traduisant la capacité de ce tissu à produire de la PE par décarboxylation de la sérine fixée à la PS et on trouve également du marquage au niveau de la PC, indiquant que la voie indirecte de production de la PC par méthylation de la PE est active aussi dans ce tissu mais plus faible que la glande digestive et les hémocytes.

➤ Au niveau des phospholipides :

L'incorporation est nulle dans la fraction X de la glande digestive et du muscle alors qu'elle représente 8.3% de la radioactivité des LT dans les hémocytes. Au niveau de la fraction Y, le marquage reste modéré et approximativement semblable dans les 3 tissus.

V- Etude *in vivo* par injection de 2-[³H]-Ethanolamine

Après 9, 24, 48 et 72 heures suivant l'injection dans le pied de 10 µL de la source de précurseur (100 µCi) les moules sont sacrifiées et les tissus (branchie, manteau, glande digestive et hémolymphe) sont récupérés et broyés dans le Folch. Au cours de l'opération de lavage des LT, la radioactivité de la phase aqueuse est mesurée en même temps que celle des lipides totaux purifiés, cette phase aqueuse contenant le précurseur qui est hydrosoluble. Ceci permet de suivre la cinétique d'incorporation du traceur dans les lipides des tissus.

NB : un contrôle effectué sur le résidu sec obtenu après filtration (composé essentiellement de protéines) montre qu'il ne possède plus que 5 à 8 % de la radioactivité totale des tissus

Les graphes figurant sur la page suivante (figure 25) montrent la cinétique de passage du traceur entre l'hydrosoluble et les LT pour « l' hémolymphe » et 3 tissus : manteau, glande digestive et branchies de la moule *Mytilus Galloprovincialis*.

Les valeurs exprimées en dpm pour 100 mg de tissu pour les 2 compartiments

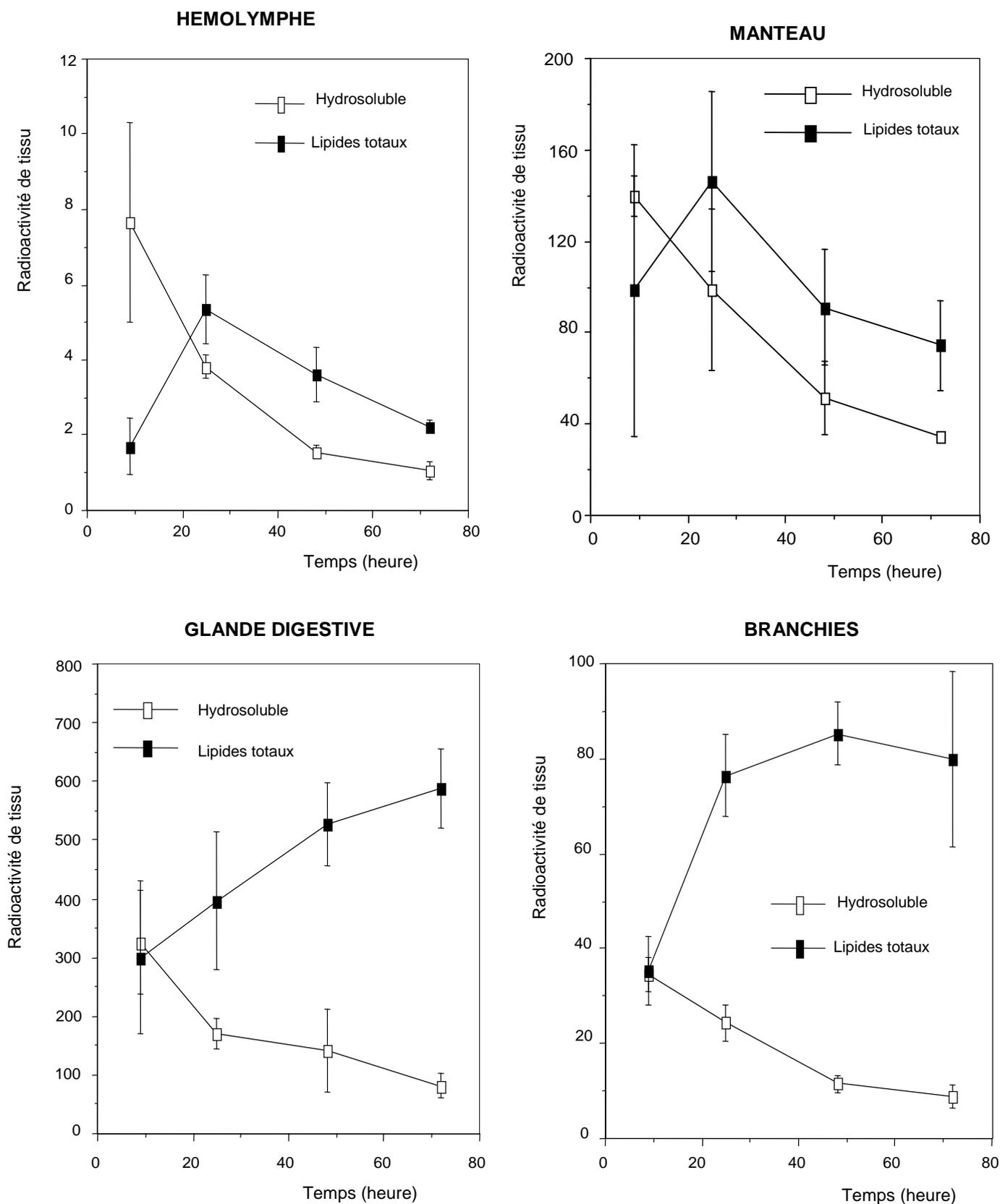


Figure 25 : Distribution *in vivo* de la radioactivité de la 2-[³H]-Ethanolamine entre les compartiments hydrosolubles et les lipides totaux des tissus de la moule de *M. galloprovincialis*.

Les graphes permettent d'observer que :

- dans la glande digestive et les branchies, on assiste à un transfert progressif de la radioactivité depuis l'hydrosoluble vers les lipides totaux où le marqueur s'accumule.
- dans l'hémolymphe et le manteau, on observe au contraire deux pools cinétiques : la radioactivité du compartiment hydrosoluble diminuant rapidement alors que celle des LT augmente pour diminuer ensuite à partir de la 24^{ème} heure. Dans ces 2 tissus, la radioactivité des lipides totaux demeure relativement constante entre 24 et 72 heures, les différences n'étant plus statistiquement significatives au-delà de 24 heures.

Après chromatographie sur couche mince, les diverses catégories de lipides (phosphonolipides X et Y, phospholipides et lipides neutres totaux) sont récupérées et comptées, leurs radioactivités étant exprimées en pour cent des dpm totales des lipides totaux (dpm % des dpm totales des LT).

Tableau 06 : Distribution in vivo de 2-[³H]-éthanolamine dans les lipides neutres, les phospholipides et les phosphonolipides des différents tissus de la moule.

	Hémolymphe	Branchie	G. Digestive	Manteau
Phosphonolipides				
X	2.4 ±0.4	1.1 ±0.1	1.5 ±0.3	5.0 ±1.3
Y	2.5 ±0.5	3.2 ±0.4	2.4 ±0.5	4.0 ±0.8
Phospholipides				
LPC	1.6 ±0.4	1.1 ±0.3	0.9 ±0.1	0.9 ±0.3
PC	21.4 ±3.3	8.6 ±2.0	10.1 ±3.8	6.7 ±1.5
PE	63.9 ±2.8	83 ±2.5	76.0 ±2.8	72.0 ±3.9
LPE	-	-	3.1 ±0.4	-
Lipides Neutres	2.6 ±0.4	1.2 ±0.1	3.7 ±0.5	3.7 ±0.7

Les radioactivités sont exprimées en pour-cent de la radioactivité des lipides totaux. Les valeurs mesurées entre 48 et 72 heures ont été réunies car ne présentant pas de différence significative dans chacun des tissus.

Pour tous, la radioactivité incorporée dans PC et PE représente 79 à 92 % de celle des lipides totaux, le pourcentage d'incorporation dans la PE étant toujours très haut (64-83 %) et approximativement semblable pour l'ensemble des tissus. Dans l'hémolymphe, le pourcentage d'incorporation dans la PC est supérieur à celui de tous les autres tissus avec 21% de la radioactivité totale des lipides.

Les résultats des marquages des phospholipides totaux, de la PE et de la PC exprimés en termes de leurs radioactivités spécifiques ou R.A.S (tableau n°=7) permet de comparer l'intensité du renouvellement de ces composés dans chacun des tissus et de mettre ainsi en évidence un éventuel transfert de phospholipides depuis un tissu « producteur » vers un ou des compartiments « receveurs ». En effet, les radioactivités spécifiques vont toujours dans un ordre décroissant depuis le lieu de production originel (où la proximité biochimique des métabolites vis-à-vis du précurseur est maximale) vers les compartiments accepteurs (où seuls les métabolites exportés sont marqués).

Tableau 07 : Radioactivité spécifique moyenne des phospholipides totaux (PL), de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE), des 4 principaux tissus de la moule.

	Hémolymphe	Branchie	Gl. Digestive	Manteau
PL	3571 ± 511	1468 ± 170	6058 ± 809	2052 ± 482
PC	1817 ± 486	377 ± 99	1571 ± 363	302 ± 99
PE	8650 ± 1222	3231 ± 370	21093 ± 3027	3610 ± 370

* Radioactivités spécifiques exprimées en dpm / µg de phosphore lipidique des PL totaux, de la PE et de la PC. Les valeurs données sont les moyennes ± SEM (n =20 animaux) des déterminations effectuées de 24 à 72 heures de marquage *in vivo*.

Le tableau n°= 7 permet de voir que les radioactivité spécifique (R.A.S) des PL totaux comme celles de la PE et la PC sont les plus faibles dans la branchie et le manteau (où elles sont d'ailleurs assez semblables pour les 3 constituants) ce qui indique que la branchie et le manteau ne peuvent pas être les « donneurs » de PE, de PC et, d'une manière générale, de phospholipides pour la glande digestive et l'hémolymphe.

Par contre, la R.A.S des phospholipides totaux, de la PC et surtout de la PE sont les plus élevées dans la glande digestive, puis dans l'hémolymphe, les valeurs mesurées dans ce dernier compartiment étant intermédiaire entre celles de la glande digestive et celles des branchies et du manteau.

Ces résultats laissent penser que la glande digestive serait un site de production de phosphatides qui pourraient ensuite être transportés vers les autres tissus via l'hémolymphe. Ceci est particulièrement net en ce qui concerne la PE :

Comme montre **la figure 26 a** (ci-dessous) il existe une corrélation inverse entre les R.A.S de la PE de l'hémolymphe et de la glande digestive ; elle relèverait d'une accumulation dans la glande digestive de PE nouvellement synthétisée.

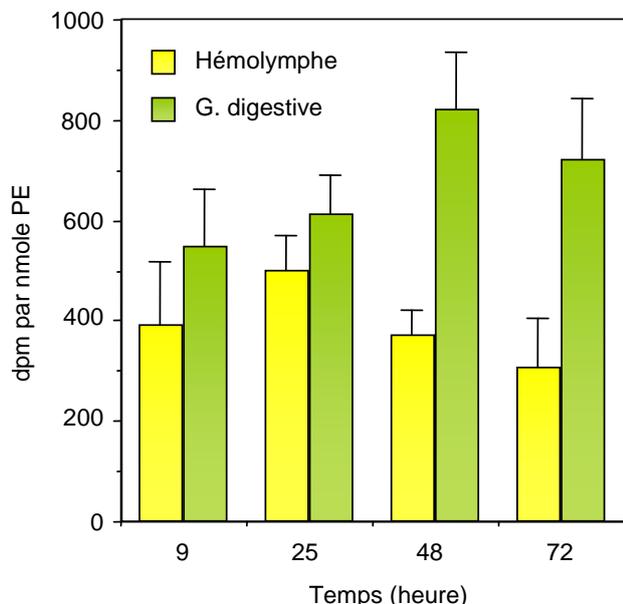


Figure 26 a: montre la R.A.S de la PE, *dpm / nmoles de PE*

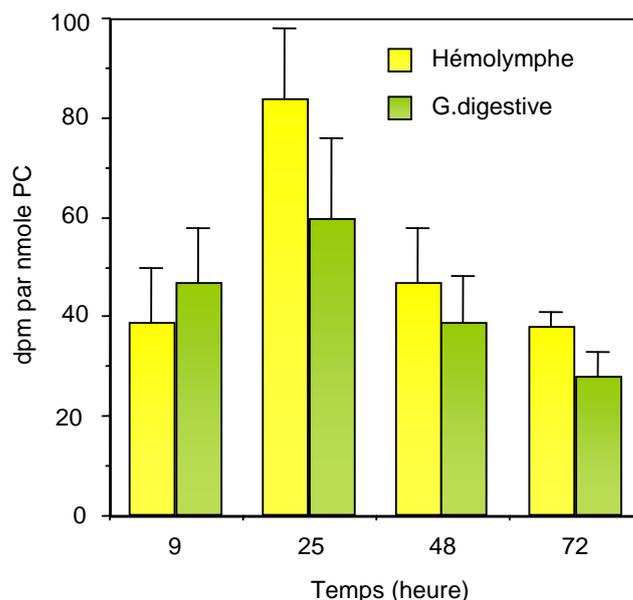


Figure 26 b: montre la R.A.S de la PC, *dpm / nmoles de PC*

Dans le cas de la PC, son marquage ne pouvant provenir que d'une transformation de PE en PC par méthylation de la copule éthanolamine de la PE, ce fait rendrait compte des valeurs très voisines des R.A.S des PC de l'hémolymphe et de la glande digestive (cette voie indirecte de synthèse de PC par N-méthylation paraissant très active dans la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis*). Comme le montre **la figure 26 b**, les variations de R.A.S de la PC de l'hémolymphe sont bien corrélées avec celles de la PC de la glande digestive, à toutes les périodes de l'expérience suivant l'injection du traceur.

VI- Composition en acides gras des PC des principaux tissus et de l'hémolymphe

Compte tenu des résultats précédents laissant présager l'existence de transferts de phosphatides entre organes via l'hémolymphe, nous avons entrepris de vérifier s'il existait ou non une parenté entre les PC des principaux organes (branchies, glande digestive, manteau) et celle circulant dans l'hémolymphe.

Pour ce faire, nous avons comparé le profil de répartition des acides gras constitutifs des PC extraites de ces tissus avec celui de la PC extraite de l'hémolymphe une fois les cellules circulantes (hémocytes) éliminées (Ce compartiment peut alors être assimilé au plasma des Vertébrés).

Tableau 08 : *Composition en acides gras de la PC purifiée de l'hémolymphe, de la glande digestive, du manteau et des branchies de la moule M. galloprovincialis en pour-cent des acides gras reconnus*

AGL	Hémolymphe	Glande digestive	Manteau	Branchie
16:0	33.0 ± 2.4	36.7 ± 3.2	21.5 ± 5.5	18.3 ± 1.4
16:1	1.6 ± 0.6	3.7 ± 0.3	2.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2
16:2	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.3
18:0	15.1 ± 1.6	10.0 ± 0.9	6.1 ± 2.3	6.7 ± 0.1
18:1w9	2.2 ± 0.5	1.4 ± 0.6	2.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1
18:1w7	2.8 ± 0.8	4.2 ± 0.9	3.6 ± 0.8	2.2 ± 0.2
18:2w6	1.8 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.5 ± 0.5
18:3w3	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1
18:4w3	1.4 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1
20:1w9	2.8 ± 0.6	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.9	2.7 ± 0.1
20:2w6	0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.6
20:4w6	6.1 ± 1.2	5.7 ± 0.8	5.9 ± 0.5	10.1 ± 0.7
20:4w3	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.7	ND
20:5w3	10.4 ± 0.3	11.8 ± 1.7	19.2 ± 2.3	13.8 ± 0.4
22:5w3	1.7 ± 0.5	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.7 ± 0.1
22:6w3	12.2 ± 0.3	14.0 ± 1.9	23.6 ± 2.8	31.2 ± 1.9

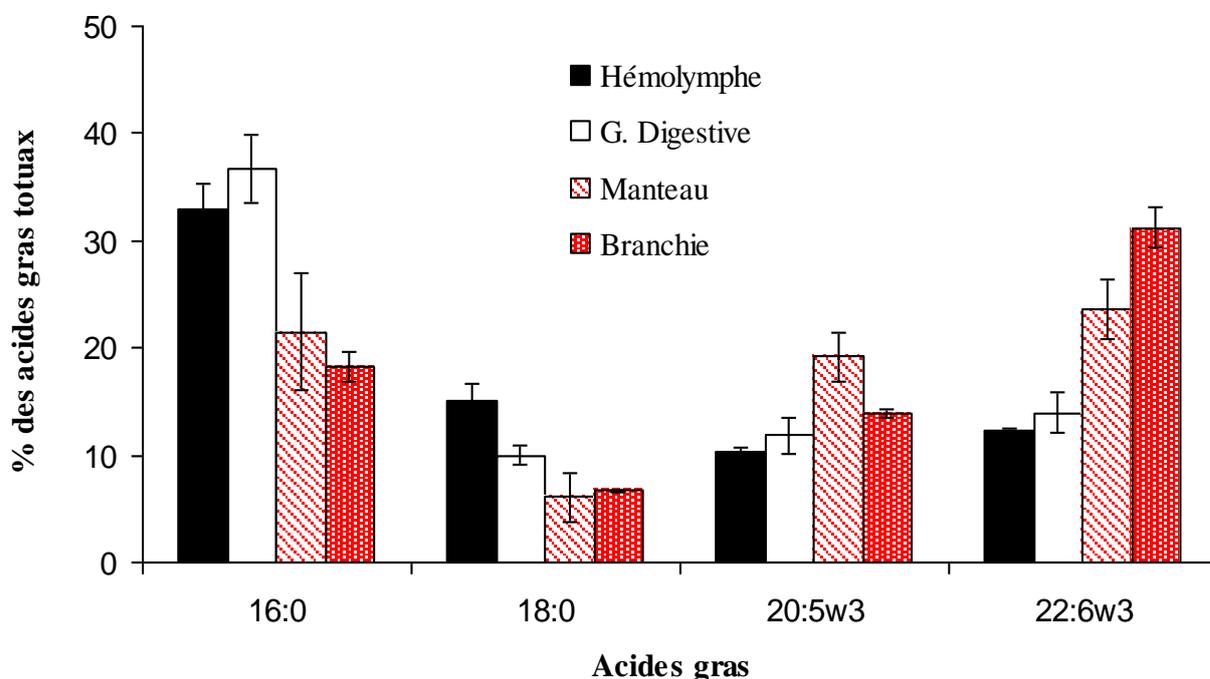
ND = Non Détecté

Le tableau n° 8 résume les données obtenues pour les principaux acides gras répertoriés, les valeurs étant exprimées en pour-cent des acides gras totaux reconnus par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standards traités dans les mêmes conditions.

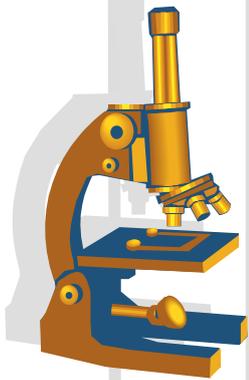
Ce tableau permet d'observer que si les acides palmitique (16 :0), stéarique (18 :0) eicosapentaenoïque (20 :5 w-3) docosahexaenoïques (22 :6 w-3) sont les principaux acides gras des PC de tous les tissus, on retrouve une similitude significative entre les PC du plasma et de la glande digestive qui présentent un pourcentage élevé en 16 :0 (33.0 et 36.7% respectivement, contre 21.5 et 18.3% pour le manteau et la branchie.) et en 18 :0 (15.1 et 10.0% contre 6.1 et 6.7% dans le manteau et la branchie).

Inversement ces PC du plasma et de la glande digestive ont des pourcentages nettement plus bas en 20 :5 w-3 (10.4 et 11.8 contre 19.2 et 13.8% dans le manteau et la branchie) et en 22 :6 w-3 (12.2 et 14.0 % respectivement contre 23.6 et 31.2% dans le manteau et la branchie). Un point particulier concerne l'acide arachidonique (20 :4 w-6), dont seule la branchie présente un pourcentage plus élevé (10.1% contre en moyenne 6% pour tous les autres tissus).

Figure 27: Composition des principaux acide gras de la phosphatidylcholine



Ces quelques résultats semblent donc bien en faveur d'une origine « glande digestive » d'au moins une partie de la PC circulant dans l'hémolymphes compte tenu de la proche similitude de la composition en acides gras des PC extraites de ces 2 compartiments.



DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude nous ont permis d'avoir une meilleure connaissance du métabolisme lipidique dans les principaux tissus de la moule de méditerranée (*M. galloprovincialis*) : branchie, glande digestive, manteau, muscle, cellules circulantes (ou hémocytes) et hémolymphe (compartiment sanguin dont on a retiré les hémocytes et analogue au plasma des Vertébrés).

Ils ont confirmé les résultats obtenus précédemment (Lubet et al. 1985 et 1986) concernant les principales catégories de lipides (lipides neutre, phospholipides) et apporté des précisions concernant les cellules circulantes qui n'avaient pas été étudiées alors. Nous avons ainsi pu confirmer dans tous les tissus l'existence de lipides phosphorés particuliers possédant une fonction aminée libre (phosphonolipides X et Y) ainsi que l'absence de la sphingomyéline chez ce mollusque bivalve.

La fraction Y est la plus abondante dans tous les tissus y compris l'hémolymphe, elle représente de 6 à 13% du phosphore lipidique total contre moins de 2% pour la fraction X. Ces 2 constituants appartiendraient à la classe des phosphonolipides car ils ne sont pas dégradés après saponification douce (qui détruit les glycérolipides et les glycérophospholipides en coupant les liaisons esters).

L'incorporation *in vivo* et *in vitro* de radiomarqueurs spécifiques (sérine et éthanolamine tritiées) nous a renseignés sur les voies de synthèse de ces composés phosphorés phospholipides et phosphonolipides. Nous avons pu observer que les incorporations de traceurs dans Y et X montraient qu'ils appartiennent aux tissus de la moule et ne proviennent pas d'une contamination éventuelle par des organismes extérieurs (algues ou autres microorganismes filtrés par la moule).

La fraction Y renfermerait au moins un constituant du type amino-éthylphosphonate qui incorpore plus fortement la radioactivité de l'éthanolamine que X, sauf dans le muscle et les hémocytes. Révélablé par la ninhydrine, le composé X comporte lui aussi une fonction aminée libre et il n'incorpore pas la sérine *in vitro*, dans la glande digestive et le muscle et au contraire elle s'incorpore assez bien dans les hémocytes. Seules des mesures par spectrométrie

de masse pourront toutefois apporter les confirmations indispensables concernant la nature de X et Y.

Les incorporations *in vitro* d'éthanolamine marquée ont permis d'étudier les voies de synthèse des phospholipides azotés et en particulier de déterminer les capacités propres aux divers tissus à synthétiser la PE et la PC.

On a pu ainsi montrer que tous les tissus étudiés synthétisaient bien la PE par voie directe (via la CDP-éthanolamine) alors que certains tissus seulement pouvaient produire la PC par N-méthylation de la PE. C'est le cas de la glande digestive, des hémocytes circulants ainsi que le muscle. La réalité de cette voie de méthylation est prouvée par la présence du marquage dans la partie choline ou éthanolamine exclusivement parce que après l'acétolyse de la PE et de la PC confirme que la radioactivité se trouve dans les copules choline de la PC et éthanolamine de la PE et non dans le groupement diacylglycérol. Le marquage de cette PC ne provient donc pas d'une dégradation de l'éthanolamine avec entrée des métabolites ainsi produits dans la copule diacylglycérol.

Il existe donc bien dans ces 3 tissus une synthèse de PC par méthylation de la PE et non une production éventuelle de PC par la voie de la CDP-choline provenant de métabolites issus de la dégradation de l'éthanolamine. Par contre, l'acétolyse des LN et le PI révèle la localisation du marquage dans leur moitié diacylglycérol seule.

En conditions *in vivo*, l'injection d'éthanolamine marquée confirme la réalité de ces voies et montre en outre l'existence d'échanges de PE et de PC vers l'hémolymphe. La réalité d'un tel transport de lipides d'origine digestive par le sérum (hémolymphe sans les hémocytes) et par les hémocytes (mais à un moindre degré) a déjà été démontrée chez d'autres bivalves comme *Crassostrea gigas* et *Diplodon Delodontus* (Pollero et al. 1985 et Allen et Conley, 1982). Des acides gras marqués sont en effet retrouvés après ingestion dans l'hémolymphe et, plus faiblement, dans les hémocytes de ces 2 mollusques, ces auteurs suggérant que les protéines et les lipoprotéines trouvées dans l'hémolymphe pourraient être impliquées dans le transport des lipides.

Nos propres résultats sont donc compatibles avec l'hypothèse d'un transport de PC par l'hémolymphe, la PC marquée trouvée dans l'hémolymphe de la moule résultant d'un échange entre l'hémolymphe et un ou des tissus « producteur ». Ce rôle paraît bien être joué par la glande digestive car c'est le seul organe où nous avons mesuré pour les PL, la PE et la PC des activités spécifiques égales ou supérieures à celles trouvées dans l'hémolymphe, durant toute l'expérience de marquage *in vivo* par l'éthanolamine tritiée.

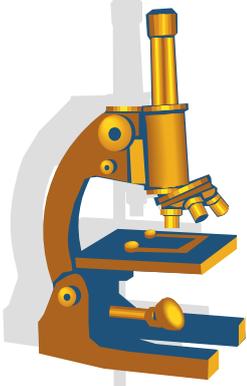
La similitude des compositions en acides gras des PC purifiées de l'hémolymphe et de la glande digestive plaide également pour leur origine commune. L'existence d'un échange de PE également laisse présager qu'en ce qui concerne la PC le transfert vers le compartiment plasmatique concerne les 2 pools de PC, à savoir celle produite par voie directe (via la CDP-Choline) et celle produite par N-méthylation de la PE. N'ayant pas entrepris de marquage *in vivo* avec de la choline radioactive on ne peut cependant pas définir à ce stade si cet échange porte préférentiellement sur l'un ou l'autre de ces pools.

On retrouve là un phénomène déjà observé chez les mammifères, les poissons et les crustacés où l'organe producteur est le foie ou l'hépatopancréas. Il est à noter que chez les Mollusques, la glande digestive, par son intense activité métabolique semble bien jouer un rôle en partie analogue à ces 2 organes et interviendrait dans le contrôle de la composition en constituants organiques de l'hémolymphe (acides aminés, lipides etc..) et de la fourniture en métabolites nécessaires aux autres tissus (Pagliassoti, 1994).

CONCLUSIONS

Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence les principaux points suivants :

- ❖ Tous les tissus étudiés possèdent bien la capacité à synthétiser leur PE par voie directe (via la CDP-éthanolamine).
- ❖ Une synthèse de PC par N-méthylation de la PE semble bien exister chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, cette voie n'étant cependant active que dans la glande digestive, les hémocytes circulants et le muscle.
- ❖ Il existe un processus de transfert de phospholipides (PE et PC) vers l'hémolymphe, mais qui seraient produits au niveau d'autres tissus.
- ❖ La PC trouvée dans l'hémolymphe présentant bien une composition en acides gras très proche de celle de la glande digestive, il semble bien que cet organe ait un rôle producteur et exportateur de phospholipides à l'instar de ce qui a été observé dans le foie des poissons et l'hépatopancréas des crustacés.
- ❖ Il est probable que l'échange de PC entre glande digestive et hémolymphe porte sur les 2 pools de PC (celle produite par voie directe et celle provenant de la méthylation de la PE)
- ❖ La méthylation de PE en PC est un processus qui apparaît particulièrement actif dans la glande digestive et les hémocytes circulants. Ceci laisserait supposer que la PC de l'hémolymphe pourrait provenir d'un double échange : d'une part via la glande digestive, d'autre part via les hémocytes.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdulmalek N. (1978).** Etude au moyen de radiotraceurs du métabolisme des phospholipides des tissus de la truite arc en ciel (*Salmo irideus*). Effets de la salinité et de la température. Doctorat d'état es-sciences, Lyon 1.

- **Allen W.V., Conley H. (1982)** Transport of lipids in the blood of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Comp. Biochem. Physiol. 71: 201-207

- **Ballou, L.R. (1992).** Sphingolipids and cell function. Immunology Today. 13: 339-341

- **Bayne B.L. (1973).** Physiological changes in *Mytilus Edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. J. Mar. Biol. Ass. UK. 53: 39-58.

- **Bodennec J. (1999)** Spécificité métabolique des bases sphingoïdes dans les leucocytes de poisson et les promyélocytes humains HL-60. Effet d'une activation mitogénique des leucocytes .Thèse doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.

- **Bodennec J., Brichon G., Zwingelstein G. (1997).** Mise en évidence d'une activation des voies de décarboxylation de la phosphatidylsérine et de la méthylation de la phosphatidyléthanolamine au cours de l'activation par la Con A des leucocytes d'un poisson. Possible existence d'un pool signalétique particulier de phosphatidylcholine. 65^{ème} Congrès Société de Physiologie, Prague. Arch. Physiol. Biochem. 105: 238-9.

- **Brichon G. (1984).** Régulation écophysiological du métabolisme des glycérophospholipides azotés chez l'anguille européenne. Effet de l'adaptation en eau douce et eau de mer à deux températures (12 et 22°C). Thèse de doctorat d'état de l'université Claude Bernard Lyon1.

- **Chapelle S., Brichon G., Zwingelstein G. (1982).** Effet of enviromental temperature on the incorporation of ³H-ethanolamine into the phospholipids of the tissues of the crabe: *Carcinus maenas*. J. Exp. Zool. 224: 289-297.

- **Dittmer J.C., Lester R.L. (1964).** A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatograms. J. Lipid Res. 5:126-127.

- **Fisk C., Subbarow Y. (1925).** The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 66: 375-400.

- **Fisher W.S. (1988).** Environmental influence on bivalve hemocyte function.
Am. Fish. Soc. Special Pub. 18: 225-237.

- **Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509.

- **Gray G.M. (1965).** Chromatography of lipids. An improved chromatographic procedure for the quantitative isolation of neutrals ceramide containing glycolipids from mammalian tissues. Biochem. Biophys. Acta. 144: 511-518.

- **Higgins J.A., Dawson R. (1979).** Asymmetry of the phospholipids across the Bilayer of rat endoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Acta. 470: 342-349.

- **Higgins J.A., Evans W.H. (1978).** Transverse organisation of the phospholipids across the Bilayer of plasma-membrane subfractions of rat hepatocytes. Biochem.J, 174: 563-567.

- **Hoskin G.P., Hoskin S.P. (1977).** Partial characterization of the hemolymph lipids of *Merceneria merceneria* (Mollusca : bivalvia) by thin layer chromatography and analyses of serum fatty acids during starvation. Biol. Bull. 152: 373-381.

- **Joseph D.J. (1982).** Lipid composition of marine and estuarine invertebrates, Part II: Mollusca. Prog. Lipid Res. 21: 109-153.

- **Kennedy E.P., Weiss S.B. (1956).** The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. J. Biol. Chem. 222:193-214.

- **Kent, C. (1995).** Enzymatic hydrolysis of sphingomyelins: use in structural analysis.
Acta.Chem. Scand. 22: 3050-3052

- **Kent, C. (1995).** Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 138-142

- **Lefur A. et Arnaud J.P. (2004).** Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques, *OCL* Vol. 11 N° 6 Novembre - Décembre P. 437

- **Lubet P. and Delongcamp D. (1969).** Etude des variations annuelles des constituants Lipidiques chez *Mytilus Edulis* L. à Luc sur Mer. C.r. Soc. Biol. 163: 1110-1112.

- **Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y., Zwingelstein G. (1986).** Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK (Mollusca : Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 279-285.

- Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y., Zwingelstein G. (1985).** Composition and metabolism of lipids in some tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Moll. Bivalvia) In vivo and in vitro incorporation of 1(3)-[3H]-glycerol. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 424-431.

- **Malgat, M., Maurice, A. And J.Baraud. (1986).** Sphingomyelin and ceramide-phosphoethanolamine synthesis by microsomes and plasma membranes from rat liver and brain. *J.Lipid Res.* 27: 251 – 260.

- **Martin M.C., Zwingelstein G., Jouanneteau J. (1970).** Composition des lipides de différents tissus de *Mytilus galloprovincialis*. *Ann. Inst. Michel Pacha* 2: 27-35.

- **Mathias S., Pena L A and Kolesnick. R. N. (1998).** Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335: 465-480.

- **Meister R. (1980).** Métabolisme des phospholipides de l'anguille (*anguilla anguilla*) influence de la salinité et de la température. Doctorat d'état es-sciences, Lyon1

- **Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P., Snider D (2004).** Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster, *Science.* 304: 297-300

- **Murray. R.K., Granmer. D.K., Mayes. P.A., Rodwell.V.W (2002).** Biochimie de Harper, 25^{ème} édition. Les Presses de l'Université Laval. Biosynthèse des phosphoglycérols P.261
- **Pagliassotti M.J., Davis S.N., Cherrington.A.D. (1994).** The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : AustinR.G. Landes Company.
- **Pollero R.J., Huca G., Brenner R.R. (1985).** Role of hemocytes and plasma on lipid transport in the freshwater mollusc *Diplodon delodontus*. Comp. Biochem. Physiol.82A: 339-343
- **Portoukalian J., Meister R., Zwingelstein G. (1978).** Improved two-dimensional solvent system for thin-layer chromatographic analysis of polar lipids on silica gel 60 precoated plates. J. Chromatogr. 152: 569-574.
- **Riboni L., Van Echten., Schwarzmann G., and Sandhaoff K. (1997).** The role of Sphingolipids in the process of signal transduction. Prog. lipid Res. 36: 153-195.
- **Rousser G., Yamamoto A., Kritchevsky G. (1971).** Cellular membranes. Structure and Regulation of lipid class composition, species difference, change with age and variation in some pathological states. Arch. Intern. Med, 127: 1105-1121.
- **Thompson R. J. (1977).** Blood chemistry, biochemical composition and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecter magellanicus* from southeast Newfoundland. J. Fish. Res. Bd. Can. 34: 2104-2116.
- **Vance, J. E (1991).** Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 266: 89-97.
- **Vance, D. E. and P. C. Choy. (1979).** How is phosphatidylcholine biosynthesis regulated? TIBS. 145-147.
- **Van Echten, G. and K. Sandhoff. (1993).** Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. J. Biol. Chem. 268: 5341-5344.

- **Voelker, D. R (1984)**. Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK-21 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2669-2673

- **Voet. D and Voet. Judith G. (2005)**. Biochimie 2^{ème} édition De Boeck Université, Biosynthèse des diacylglycérophospholipides P. 970-971

- **Voogt M.T. (1983)**. Lipids their distribution and metabolism. In The mollusca. Vol.1, P. 329-369, Acad . Press, New York.

- **Waldi D. (1962)**. Preparation and use of spraying reagents. In: * Thin Layer Chromatography* Stahl E. Ed. P. 496 Springer-verlag, Berlin.

- **Yeung, S. K. F and A. Kuksis. (1976)**. Utilisation of L-serine in the *in vivo* biosynthesis of glycerophospholipids by rat liver. Lipids. 11: 498-505.

- Zwall R.F.A., Roelofsen B., Colley M. (1973)**. Localisation of red cell membrane constituents. Biochem, Biophys.Acta. 5: 117-130.

- **Zwingelstein G. (1979)**. Les effets de l'adaptation de l'eau de mer sur le métabolisme lipidique du poisson. Oceanis. 5: 117-180

LISTE DES SITES WEB :

Comité National de la Conchyliculture. (2006). Biologie des moules
<http://www.coquillages.com/index.php?rub=1&page=42&type=theme&id=40>

Delhaize E. (1999). Enzymatic reaction of: CDP-diacylglycerol:L-serine O-phosphatidyltransferase (phosphatidylserine synthase)
<http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=ENZYME&object=MONOMER-12860>

Denoulet. P., Boucher. D., Maurel. M. C., Sobczak-Thepot. J Benlot. C et Blanchouin. N (2005). Sphingomyélines ou sphingolipides phosphorylés.

Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie

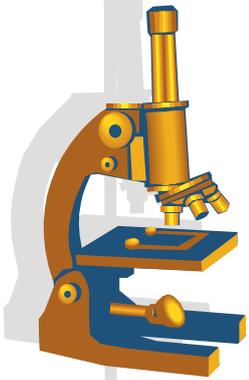
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/coursBC/lipide/lipide1.html>

Encyclopédie Microsoft Encarta (1997). Structure de la membrane plasmique.

http://fr.encarta.msn.com/media_461547459_761556947_1_1/Structure_de_la_membrane_plasmique.html

Gilbert M. (2005). Les lipides membranaires.

<http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/Membrane/FBMA2.htm>



PERSPECTIVE

PERSPECTIVE

Les résultats obtenus au cours de ce stage nous ont permis de dégager quelques pistes à explorer concernant le métabolisme des lipides phosphorés de la moule que nous nous proposons d'approfondir au cours d'un travail de thèse.

Nous avons pu montrer que si la voie de synthèse directe de la PE à partir de l'éthanolamine existait dans tous les tissus étudiés, la possibilité de réaliser la synthèse de la PC par méthylation de la PE semblait être un processus localisé de manière significative seulement dans certains tissus comme la glande digestive, les hémocytes et le muscle.

L'existence de cette voie indirecte dans seulement quelques tissus pose alors le problème de définir si son rôle ne serait pas, comme chez certains poissons et crustacés (Chapelle, 1982 ; Brichon, 1984), de suppléer à un déficit de PC produite selon sa voie directe (via la CDP-choline) et lié à un besoin accru en PC dans certaines conditions environnantes (modifications de la température ou de la salinité ambiantes, carence alimentaire en choline)

En faveur de cette hypothèse, des processus de transferts de phospholipides entre tissus via l'hémolymphe ont bien été mis en évidence chez la moule au cours de ce stage. Ils pourraient jouer un rôle analogue à celui découvert chez les poissons et les crustacés et intervenir dans la restructuration des membranes cellulaires pour peu que ces échanges de phospholipides portent sur des espèces moléculaires de phospholipides différentes suivant les circonstances.

Pour aborder ces problèmes, nous envisageons d'effectuer des expériences en double marquage: choline / éthanolamine radioactives. Parmi ces études nous nous proposons :

- ✓ De suivre le fonctionnement simultané des voies de synthèse directe et indirecte de la PC par N-méthylation de la PE et de déterminer l'influence éventuelle des conditions environnantes imposées aux mollusques (étude *in vitro*)

- ✓ De suivre *in vivo* l'apparition dans l'hémolymphe de PC produites par l'une et l'autre voie dans d'autres compartiments ou tissus, donc de montrer quel est le compartiment « producteur » et quels sont les compartiments « demandeurs »
- ✓ De mesurer l'intensité de ces échanges selon les circonstances.
- ✓ De vérifier enfin si ces échanges PC via l'hémolymphe portent ou non sur des espèces moléculaires différentes (définies par leur composition en acides gras)

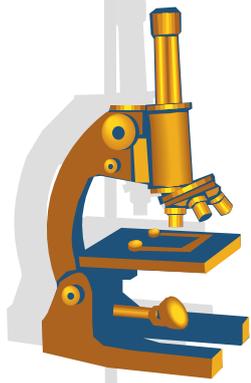
Au cours de nos expériences *in vitro*, nous avons enfin observé que l'incubation des divers tissus (muscle et glande digestive) se traduisait, dès la première heure d'incubation, par l'apparition de cellules libres et qui sembleraient avoir des caractéristiques communes avec les hémocytes circulants. Elles peuvent être récupérées par centrifugation du milieu d'incubation. Parmi nos projets figure donc une étude de ces cellules libres, qu'il s'agisse des hémocytes circulants ou des cellules issues des tissus. Nous chercherons à mieux les caractériser, du point de vue morphologique (par histologie) et de leur composition lipidique (profils de répartition des phospholipides, composition en acides gras) afin de les comparer entre elles et aux tissus qui les ont libérées. Nous rechercherons également si d'autres tissus (manteau, branchie ...) sont capables de libérer de telles cellules et à en définir là aussi la composition.

Nous étudierons les capacités de ces cellules (hémocytes circulants, cellules libérées après incubation des tissus) à synthétiser leurs constituants lipidiques, afin de vérifier si il y a des différences selon leur origine et pour chaque type de tissu avec l'organe les ayant libérées. Ces études se feront à l'aide des précurseurs marqués utilisés durant notre stage et en opérant selon 2 modalités complémentaires :

- ❖ en récupérant ces cellules après incubation des tissus puis en les mettant en présence des précurseurs afin de vérifier les capacités propres à ces cellules à synthétiser leurs phospholipides.
- ❖ en procédant à l'incubation des tissus après qu'ils aient libéré ces cellules avec les mêmes précurseurs (Ceci devrait permettre de voir si dans les tissus et les cellules libérées les voies de synthèse fonctionnent de manière identique ou non.)

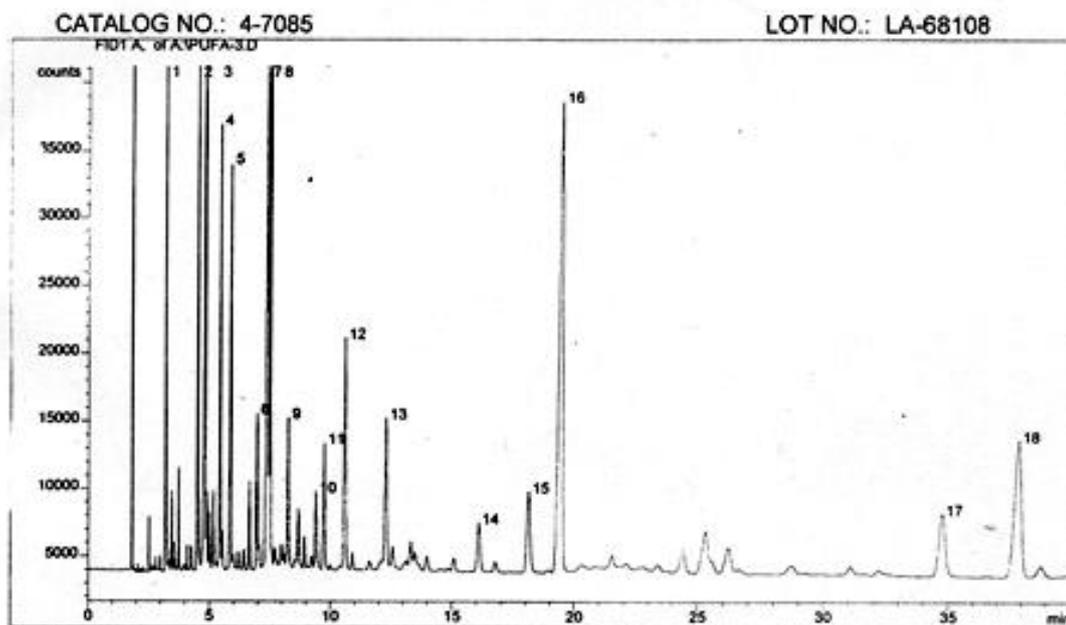
D'après la littérature, les hémocytes des mollusques semblent jouer un rôle proche de celui des cellules lymphocytaires des Vertébrés et en outre seraient des cellules souches totipotentes pouvant régénérer n'importe quel tissu de la moule (Mount et al. 2004). Il serait dès lors intéressant de vérifier si les activateurs habituels des lymphocytes des Vertébrés, comme la Concanavaline A, ne produiraient pas sur ces hémocytes et ces cellules libérables des effets voisins de ceux mis en évidence sur les lymphocytes des poissons (Bodennec, 1999)

A ce titre, nous essaierons aussi d'élucider le rôle des composés X et Y mis en évidence dans les tissus de la moule (et qui semblent appartenir au groupe des sphingophospholipides) car ils pourraient peut être remplir le rôle de la sphingomyéline des Vertébrés, absente chez les Bivalves, dans le cycle général des sphingolipides et de leurs dérivés (bases sphingoïdes, céramides etc...)



ANNEXE

DESCRIPTION: PUFA-3



**For qualitative identification only. Product is extracted from natural sources. Relative peak presence and quantities may vary from lot to lot.

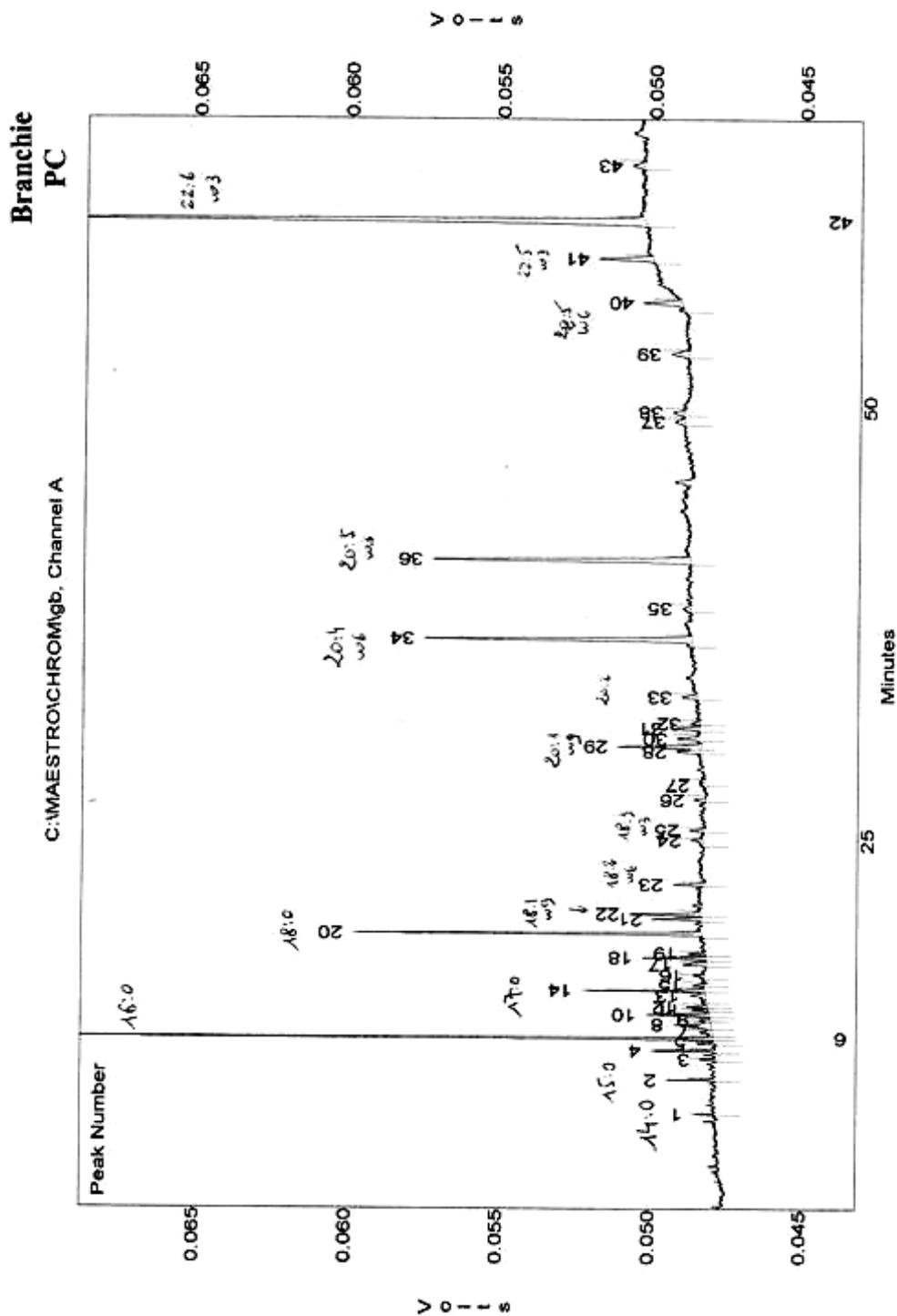
Conditions:

Column	Omegawax 320, 30m x 0.32mm ID, 0.2 μ m film
Cat. No.	2-4152
Oven Temp.	200 °C
Carrier	helium, 25cm/sec, set at 200°C
Detector	FID, 260° C
Injection	1 μ l, PUFA-3 (cat. # 4-7085), split: 100:1, 250°C

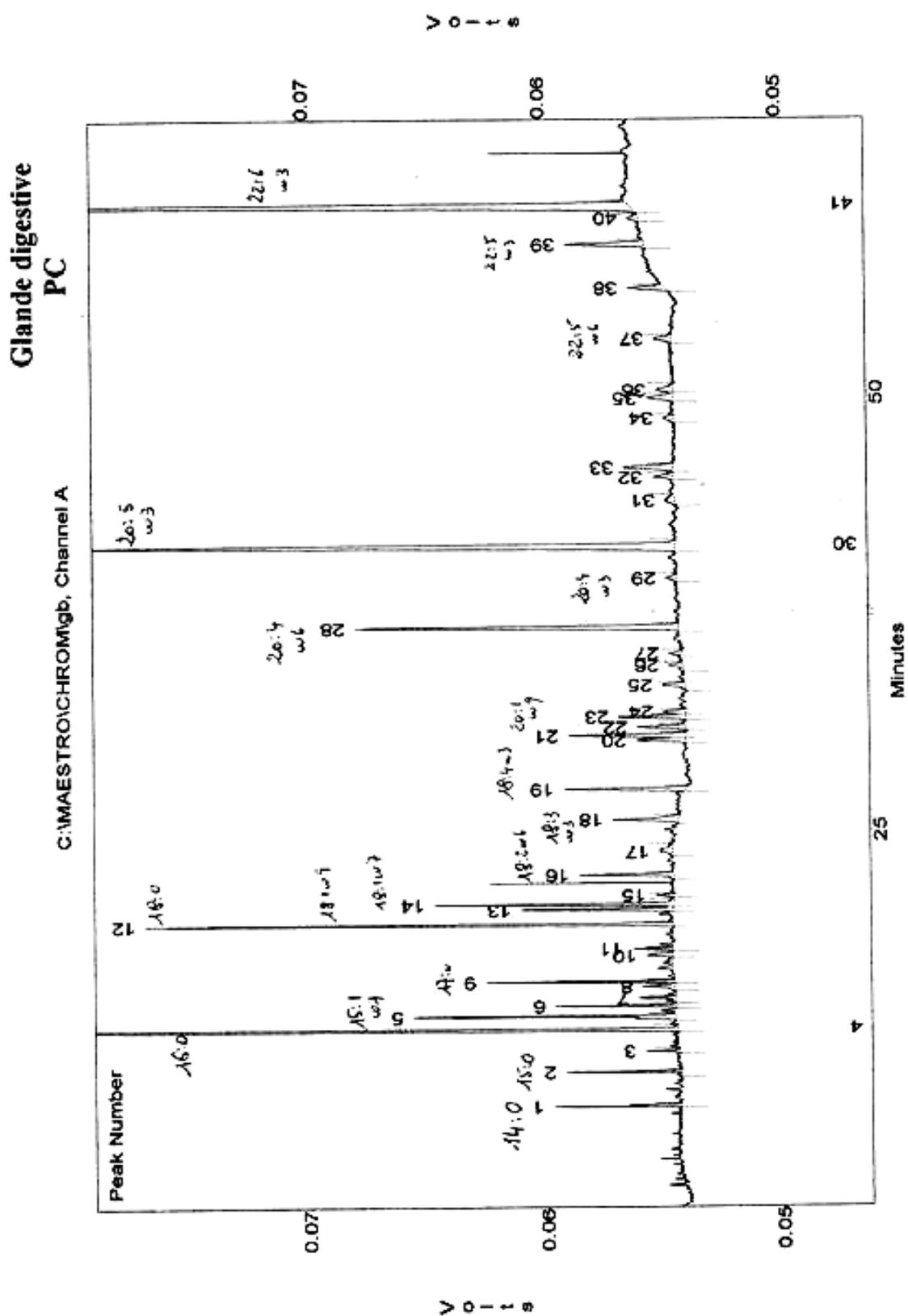
Elution Order

1. C14:0	10. C18:3 w4
2. C16:0	11. C18:3 w3
3. C16:1w7	12. C18:4 w3
4. C16:2 w4	13. C20:1 w9
5. C16:3 W4	14. C20:4 w6
6. C18:0	15. C20:4 w3
7. C18:1w9	16. C20:5 w3
8. C18:1w7	17. C22:5 w3
9. C18:2 w6	18. C22:6 w3

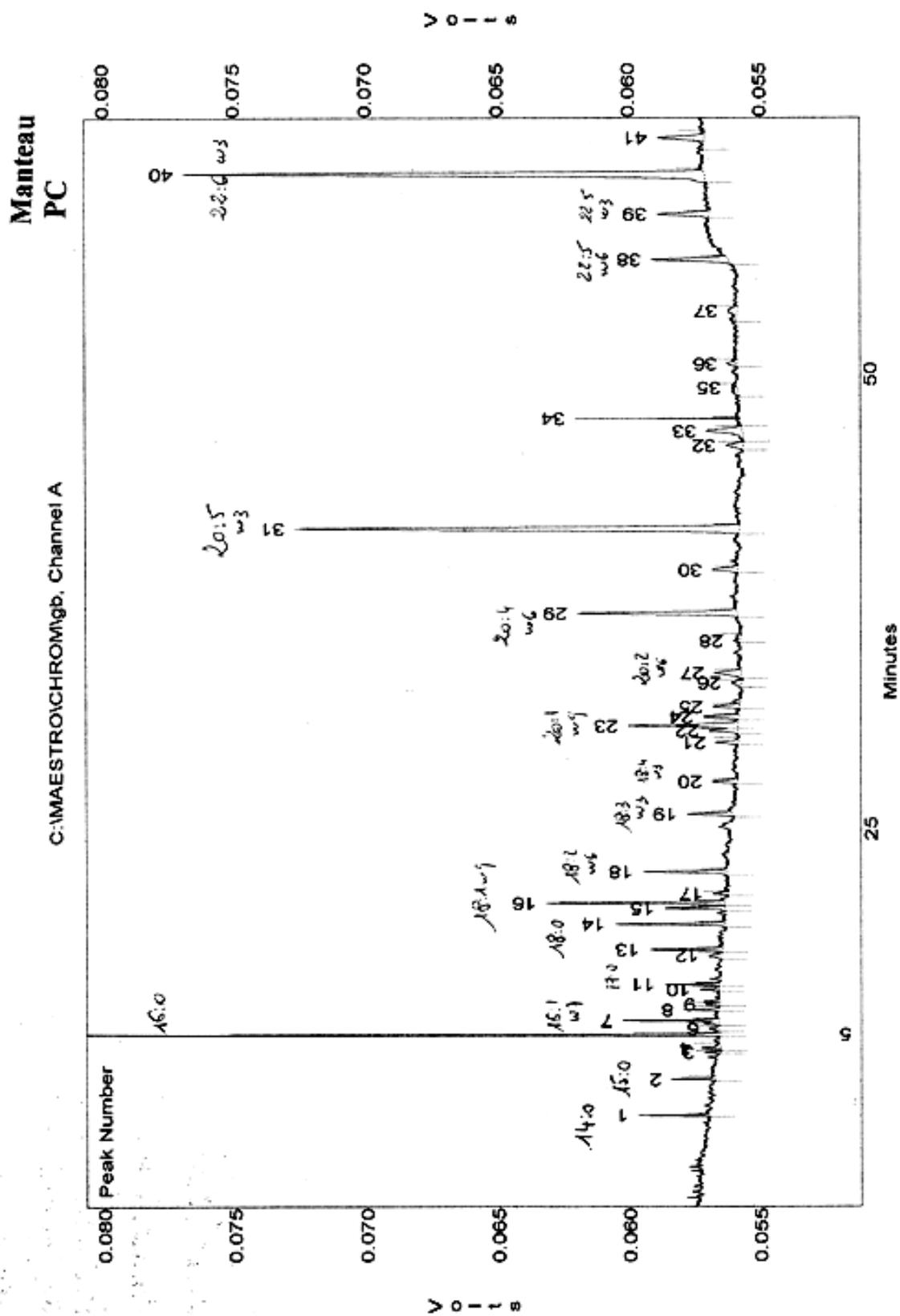
ANNEXE N°=1: analyse par GLC du mélange standard d'acides gras méthylés PUFA n°3
« from Menhaden oil » Supelco 4-7085.

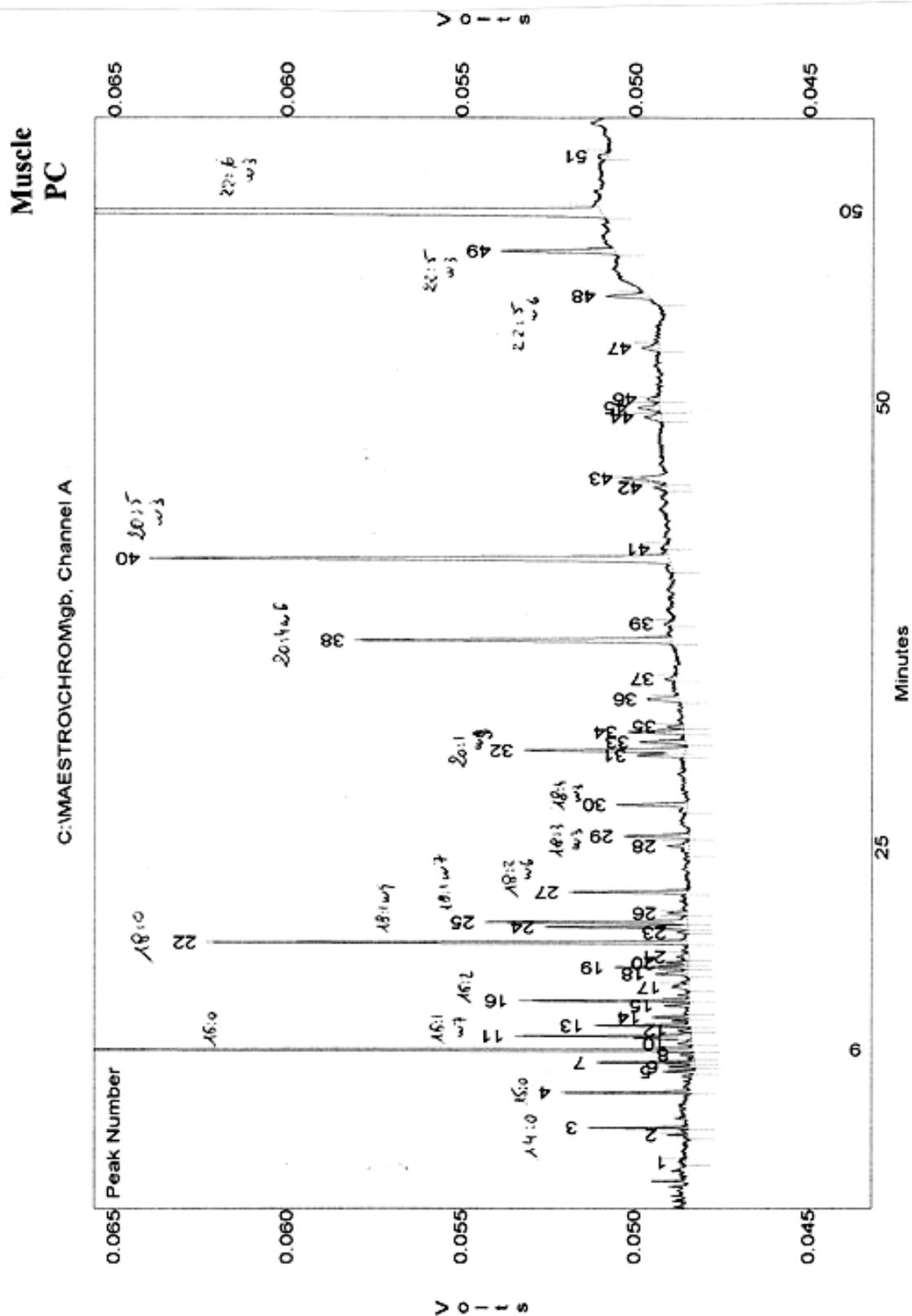


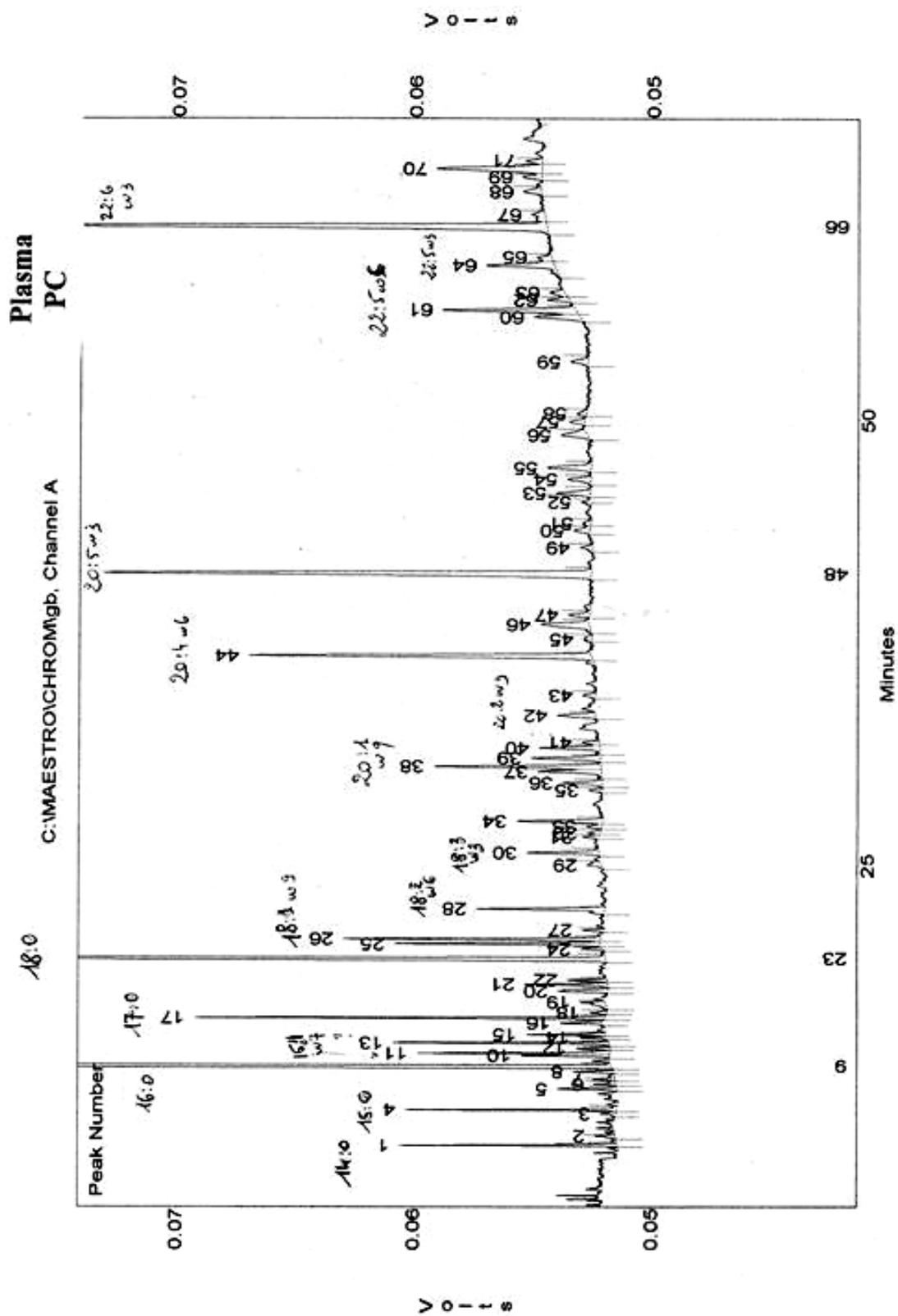
ANNEXE N°=2: tracé de l'analyse par GLC de la **PC de Branchie** de *M. galloprovincialis*.



ANNEXE N°=3: tracé de l'analyse par GLC de la PC de Glande Digestive.

ANNEXE N°=4: tracé de l'analyse par GLC de la **PC de Manteau**.

ANNEXE N°=5: tracé de l'analyse par GLC de la **PC de Muscle**.



ANNEXE N°=6: tracé de l'analyse par GLC de la PC d'Hémolymphe.