



HAL
open science

Etude et valorisation des principes actifs de biominéralisation du calcium pour les applications pharmaceutiques.

Aurore Dissaux

► **To cite this version:**

Aurore Dissaux. Etude et valorisation des principes actifs de biominéralisation du calcium pour les applications pharmaceutiques.. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2010. Français. NNT : 2010ORLE2072 . tel-00665124

HAL Id: tel-00665124

<https://theses.hal.science/tel-00665124>

Submitted on 1 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

THÈSE présentée par :

Aurore DISSAUX

Ingénieur en Biotechnologie UTC

soutenue le : **16 Décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Interface Chimie-Biologie : Systèmes moléculaires à visée thérapeutique

**Etude et valorisation des principes actifs de
biominéralisation du calcium pour les
applications pharmaceutiques**

THÈSE dirigée par :

Xavier BOURRAT
Evelyne LOPEZ

Chargé de Recherche-CNRS, Université d'Orléans
Professeur au Museum de Paris-CNRS

RAPPORTEURS :

Daniel CHATEIGNER
Patricia ROUSSELLE

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie
Directrice de Recherche-CNRS, Université de Lyon

JURY

Patrice ANDRE
Ary BRUAND
Elian LATI
Gérard REDZINIAK

Directeur de Département, LVMH Recherche
Professeur, Vice président Université d'Orléans
Directeur du Laboratoire Bio-EC
Président de l'Association Française de Cosmétologie

SOMMAIRE

Introduction Générale.....	11
CHAPITRE I : Revue Bibliographique	15
<i>I.1. Importance du Calcium dans l'organisme</i>	<i>16</i>
I.1.1. Le calcium	16
I.1.2. L'Homéostasie du Calcium.....	17
I.1.3. Les tissus de soutien	18
I.1.3.1 La peau.....	18
I.1.3.2. Les os	22
I.1.4. Le rôle physiologique du calcium dans les tissus de soutien.....	23
I.1.4.1. Le rôle du calcium dans la peau	23
I.1.4.2. Le calcium et la physiologie de l'os.....	24
I.1.5. Le calcium et la pharmacopée	26
I.1.5.1. En pharmaceutique.....	26
I.1.5.2. En cosmétique	28
<i>I.2. Le calcium dans la nature : l'exemple du banc à rudistes d'Orgon.....</i>	<i>29</i>
I.2.1. Contexte géologique: Paléogéographie du Crétacé dans le bassin du Sud-Est de la France.....	29
I.2.1.1. Paléogéographie	29
I.2.1.2. Colonne stratigraphique	34
I.2.2. Qu'est ce qu'un rudiste ?.....	35
I.2.3. Avantages du site d'étude	38
<i>I.3. Biominéralisation du calcium et Pharmacopée</i>	<i>39</i>
I.3.1. La Nacre, exemple actuel d'association organo-minérale.....	39
I.3.2. La peau et les associations organo-minérales	40
I.3.3. L'os et les associations organo-minérales	41
I.3.3.1. L'Ostéoformation.....	41
I.3.3.2. Les Potentialités ostéogènes de la Nacre	43
CHAPITRE II : Stratégie de l'Etude	47
CHAPITRE III : Diagenèse et Préservation de la matrice organique de Biominéralisation dans les plateformes carbonatées	51
<i>III.1. Résumé de la publication 1.....</i>	<i>52</i>
<i>III.2. Publication 1: Diagenesis and preservation of biomineralization organic matrix in platform limestones</i>	<i>54</i>
CHAPITRE IV : Les Calcaires Urgoniens, une source de Protéines et de Lipides	73
<i>IV.1. Résumé de la publication 2</i>	<i>74</i>
<i>IV.2. Publication 2: Limestones, a source of proteins and lipids.....</i>	<i>76</i>
CHAPITRE V: Activité Topique du Calcium sur explants de Peau Humaine régulée par des Molécules Fossiles	95
<i>V.1.. Résumé de la publication 3: Activité topique du calcium régulée par l'extrait OrgonE sur peau humaine maintenue en survie</i>	<i>96</i>
<i>V.2. Publication 3: Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules.....</i>	<i>98</i>
<i>V.3. Résumé de la publication 4 : Activité topique du calcium régulée par l'extrait OrgonW sur peau humaine maintenue en survie</i>	<i>113</i>
<i>V.4. Publication 4: Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules.....</i>	<i>115</i>

CHAPITRE VI: Activité des biocalcaires sur l'ostéogenèse	129
<i>Vi.1. Introduction.....</i>	130
<i>Vi.2. Modélisation in vitro des étapes de la différenciation osseuse.....</i>	130
Vi.2.1. Choix des cellules	130
Vi.2.1.1 Les cellules souches de moelle osseuse	131
Vi.2.1.2. Les fibroblastes.....	131
Vi.2.1.3. Les pré-ostéoblastes.....	132
Vi.2.2. Les inducteurs	132
Vi.2.3. Les marqueurs de la différenciation ostéoblastique.....	133
Vi.2.3.1. Collagène de type I	135
Vi.2.3.2. Activité Phosphatase Alcaline (PAL)	135
Vi.2.3.3. Ostéocalcine	136
Vi.2.3.4. Nodules de minéralisation.....	136
<i>Vi.3. Matériels and Méthodes</i>	136
Vi.3.1. Les protocoles d'extraction	136
Vi.3.2. Les cellules étudiées.....	137
Vi.3.3.L'estimation de la prolifération cellulaire et dosage des marqueurs phénotypiques.....	139
<i>Vi.4. Activité des extraits sur les cellules de la lignée osseuse.....</i>	141
Vi.4.1. Réponse des cellules fibroblastiques MRC-5.....	141
Vi.4.2. Réponse des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.....	145
Vi.4.3. Réponse des cellules stromales de moelle osseuse D1-ORL-UVA.....	147
CHAPITRE VII : Discussion et Conclusion	159
Perspectives.....	167
"Un nouveau chapitre de la thèse".....	171
Références Bibliographiques.....	191
Annexes	213

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. EPIDERME AVEC SES DIFFERENTES COUCHES	19
FIGURE 2. DIFFERENCES DE MORPHOLOGIE DU DERME ET DE L'EPIDERME SELON L'AGE DE LA PEAU (SOURCE : LVMH).....	24
FIGURE 3. CONFIGURATION PALEO GEOGRAPHIQUE DU SUD-EST DE LA FRANCE AU BARREMIEN SUPERIEUR. ON DISTINGUE LA FOSSE EN GRIS, LA CEINTURE BIOCLASTIQUE (RAYE) ET LA PLATEFORME CARBONATEE EN BLANC. (MASSE AND FENERCI, 2006).....	30
FIGURE 4. CARTE REPRESENTATIVE DE LA PALEO GEOGRAPHIE DU BASSIN SUD-EST DE LA FRANCE AU BARREMIEN SUPERIEUR (MASSE, 1993)	31
FIGURE 5. ORGANISATIONS DES PLATES-FORMES URGONIENNES PROVENÇALES : PLATE-FORME AVEC UNE BARRIERE EXTERNE ET ADOSSEE A UN DOMAINE INSULAIRE EMERGE.C : CORAUX, CR : CRINOÏDES ET BRYOZOAIRE, T : TURRITELLES, R : RUDISTES, SP : SPONGIAIRES, BC : ACCUMULATIONS BIOCLASTIQUES, IL : INFRA LITTORAL, CL : CIRCALITTORAL (RAT ET PASCAL, 1979).....	32
FIGURE 6. CARTES PALEO GEOGRAPHIQUES CORRESPONDANT AUX PHASES PRINCIPALES DE L'EVOLUTION DE LA PLATEFORME CARBONATEE (MASSE, 1993).....	34
FIGURE 7. STRATIGRAPHIE A ORGON (MASSE, 1993).....	35
FIGURE 8. REQUIENIA AMMONIA D'ORGON. BARREMIEN SUPERIEUR (EN BAS, UNE COUPE CARACTERISTIQUE DU BIVALVE MONTRANT SON EPAISSE COQUILLE)	36
FIGURE 9. CHAMA VIVANT DANS LE GOLFE D'AQABA (HOTTINGER,1984). LA VALVE SPIRALE EST FIXEE ET L'OUVERTURE RESTE PLUS OU MOINS PARALLELE AU FOND MARIN.....	37
FIGURE 10. DESCRIPTION DES DEUX VALVES D'UNE REQUIENIA.....	37
FIGURE 11. L'OBSERVATION DE LA NACRE AVEC DES GROSSISSEMENTS CROISSANTS MET EN EVIDENCE SA STRUCTURE MULTIECHELLE (LOPEZ ET AL, 2008):.....	39
A) AU MICROSCOPE A BALAYAGE (MEB) (50 X 50 MM ²)	39
B) AU MICROSCOPE A FORCE ATOMIQUE (AFM) (0,5 X 0,5 MM ²).....	39
C) AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) (0,005 X 0,005 MM ²)	39
FIGURE 12. REGULATION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA DIFFERENCIATION DE L'OSTEOBLASTE (LIAN ET AL, 1999).....	43
FIGURE 13. REACTION AUTOUR D'UN FRAGMENT DE NACRE POSE DANS UNE CULTURE CELLULAIRE D'OSTEOBLASTES HUMAIN. CARACTÈRE OSTÉOGÉNIQUE DE LA NACRE.	44
FIGURE 14. SEM SECONDARY ELECTRON MICROGRAPH OF A SHELL OF REQUIENIA AMMONIA WITH LARGE PALISSADIC SPARY CALCITE (SHELL ON TOP) AND ADJACENT PELOIDAL SEDIMENT.	59
FIGURE 15. CATHODOLUMINESCENCE EMISSION OF A REQUIENIA AMMONIA SHELL(BACK). ON TOP, SCHEMATIC OF THE INTERPRETATIVE SCENARIO OF THE DIAGENESIS (SCALE IS 350µM).	62
FIGURE 16. OUTER LAYER OF REQUIENIA AMMONIA OBSERVED WITH POLARIZED LIGHT (DLCM) : CHINESE HAT-LIKE FEATURES ARE SEEN IN THE CENTER OF THE PRISMATIC CALCITE CRYSTALS.	63

FIGURE 17. EVIDENCE OF ENDOLITHIC FAUNAS TRACKS. IN THIS EXAMPLE: FROM THE INTERNAL CAVITY, INSIDE THE OUTER DLMC LAYER (THE INTERNAL LAYER WAS DISSOLVED AND THE RECRYSTALLIZATION OF THE OUTER LAYER ALREADY DONE) (SCALE IS 350µM).....	64
FIGURE 18. INTERNAL BIOCLASTIC SEDIMENTATION (FORAMINIFERS, MILLIOLS, ENTROQUES) OBSERVED WITH CATHODOLUMINESCENCE: MICROFOSSILS (GREEN), PRIMARY MICRITIC CEMENT AND ENDOCLASTS (ORANGE) AND SECONDARY SPARITIC CEMENT (DARK) (SCALE BARRE IS 250µM).....	65
FIGURE 19. EPMA ELEMENTAL MAPPING ACROSS THE SHELL OF REQUIENIA AMMONIA, SAME AREA AS IN FIG.15 (A): OPTICAL IMAGE WITH OUTER LAYER ON TOP AND INTERNAL FILLING IN THE BOTTOM; (B): MG; (C): SR AND (D): NA.....	66
FIGURE 20. A.OPTICAL MICROSCOPY IMAGE OF THE SHELL OF REQUIENIA AMMONIA. B. EPIFLUORESCENCE OF THE SQUARED ZONE OF A: CALITIC CRYSTALS FLUORESCCE IN GREEN, PORES IN BLACKS AND THE ORGANIC MATRIX IN YELLOW (PL: POLARIZED LIGHT; FL: ULTRAVIOLET ILLUMINATION; SCALE BARRES ARE 100µM).....	67
FIGURE 21. OUTER SHELL LAYER OF REQUIENIA AMMONIA. (A): SEM SECONDARY ELECTRON IMAGE OF THE FRACTURE SURFACE (SCALE BARRE IS 10µM) AND (B): SCHEMATIC IN CROSS SECTION SHOWING THE CRACK PROPAGATION WITHIN CALCITE WITH DEFLECTION AT EACH FILM INTERFACE PRODUCING THE TYPICAL SURFACE FEATURES SEEN WITH SEM (ARROWS IN A: TRACE OF FILM).....	68
FIGURE 22. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY OF GRINDED SHELL. FLAT PARTICLES EXHIBIT TYPICAL AMORPHOUS ORGANIC DIFFRACTION PATTERN. THE MOST ABUNDANT PARTICLES OF THE SHELL ARE CALCITE GRAINS WITH THEIR TYPICAL CRYSTALLINE DIFFRACTION PATTERN.	69
FIGURE 23. FTIR ANALYSIS OF ORGONASD SAMPLE.	83
FIGURE 24. HPLC-GEL FILTRATION CHROMATOGRAMS OF ORGONED, ORGONWAD AND ORGONWD EXTRACTS OBTAINED AT 226NM. STANDARD MIXTURE HAS BEEN PREVIOUSLY ANALYZED AND THE SIZE IS INDICATED BELOW THE CHROMATOGRAM. MAU= MILLI ABSORBANCE UNITS.	84
FIGURE 25. AMINO-ACID ANALYSES OF THREE ORGON EXTRACT SAMPLES. NACRE EXTRACT, EXTRACTED WITH WATER, WAS USED AS A CONTROL.....	86
FIGURE 26. AMINO-ACID ANALYSES OF ORGONWD WITH (PURPLE) OR WITHOUT (BLUE) THE HYDROLYSIS STEP.....	87
FIGURE 27. COMPARED ELECTROPHORESIC GELS (SDS-PAGE) OF THE CONTROL NACRE PINCTADA MARGARITIFERA VS ORGONWD (SAME EXTRACTION PROTOCOL). 1. ORGONWD AT A CONCENTRATION OF 1.5MG OF PROTEINS/100µL, 2. ORGONWD AT 1.5MG OF PROTEINS/150µL, 3. ORGONWD AT 1.5MG OF PROTEINS/200µL AND 4. ORGONWD AT 1.5MG OF PROTEINS/300µL. ORGONWD EXHIBITS PROTEINS 12, 18, 20 AND 35 KDA IN SIZE.....	88
FIGURE 28. TLC ANALYSIS OF LIPIDS EXTRACTED FROM ORGONE (C) AND ORGONWL (D). LINE A AND B: STANDARD.....	90
FIGURE 29. MORPHOLOGY OF EXPLANTS AFTER 9-10 DAYS.	103
A: MORPHOLOGY OF THE UNTREATED SKIN EXPLANT (CONTROL)	103
B: EXPLANT TREATED WITH ORGON E: IMPORTANT CELL RENEWAL WITH GOOD MORPHOLOGY OF THE LIVING EPIDERMIS AND A THICK LAYER OF KERATINOCYTES AT THE TERMINAL STAGE OF DIFFERENTIATION	103
C: EXPLANT TREATED WITH BLANE: SEVERAL DISORDERS APPEAR.....	103

D: EXPLANT TREATED WITH NACRE: ACANTHOSIS WITH CERTAIN PHYSIOLOGICAL DISORDERS	103
FIGURE 30. IMMUNOSTAINING OF COLLAGEN IV AT 9 / 10 DAYS.....	105
A: STAINING OF COLLAGEN IV ON THE UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	105
B: EXPLANT TREATED WITH ORGONE: THE STAINING REMAINS UNCHANGED COMPARED TO THE CONTROL (A)	105
C: EXPLANT TREATED WITH BLANE, THE MINERAL FRACTION: OVEREXPRESSION AT THE DEJ AND THE ANNEXES.....	105
D: EXPLANT TREATED WITH NACRE: STAINING REMAINS UNCHANGED.....	105
FIGURE 31. IMMUNOLABELLING OF COLLAGEN III AT 9/10 DAYS.	106
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL).	106
B: EXPLANT TREATED WITH ORGONE: COLLAGEN III EXPRESSION EVENLY THROUGHOUT THE DERMIS.	106
C: EXPLANT TREATED WITH BLANE: COLLAGEN III EXPRESSION EVENLY THROUGHOUT THE DERMIS.	106
D: EXPLANT TREATED WITH NACRE: STAINING IS UNCHANGED COMPARED TO THE CONTROL.	106
FIGURE 32. IMMUNOSTAINING OF COLLAGEN I AT 9/10 DAYS.	107
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL).	107
B: EXPLANT TREATED WITH ORGONE: THE EXPRESSION OF COLLAGEN I IS MODERATELY HIGH COMPARED TO THE CONTROL.....	107
C: EXPLANT TREATED WITH BLANE: THERE IS ONLY A SLIGHTLY HIGHER EXPRESSION OF COLLAGEN I COMPARED TO THE CONTROL.....	107
D: EXPLANT TREATED WITH NACRE: STIMULATION OF THE EXPRESSION OF COLLAGEN I....	107
FIGURE 33. BLUE-ALCIAN P.A.S. COLORATION OF GAGS AT 9/10 DAYS.	108
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	108
B: EXPLANT TREATED WITH ORGONE: NEUTRAL GAGS FORMED A PINK / PURPLE STRIP ALONG THE DEJ, WHILE ACIDIC GAGS ARE SIGNIFICANTLY OVEREXPRESSED IN BLUE THROUGHOUT THE PAPILLARY DERMIS, ASSOCIATED WITH THIN FIBERS (HYALURONIC ACID).	108
C: EXPLANT TREATED WITH BLANE: CLEAR OVEREXPRESSION OF NEUTRAL GAGS (PINK) AND ABSENCE OF ACIDIC GAGS.....	108
D: EXPLANT TREATED WITH NACRE: LOW OVEREXPRESSION OF NEUTRAL GAGS (PINK) AND ABSENCE OF ACIDIC GAGS.....	108
FIGURE 34. MORPHOLOGY OF EXPLANTS AFTER MASON’S TRICHROME COLORATION 9-10 DAYS.....	120
A: MORPHOLOGY OF THE UNTREATED SKIN EXPLANT (CONTROL)	120
B: EXPLANT TREATED WITH ORGON W: MARKED INCREASE OF THE THICKNESS OF THE STRATUM CORNEUM.....	120
C: EXPLANT TREATED WITH NACRW: OBSERVATION OF PHYSIOLOGICAL DISORDERS	120
D: EXPLANT TREATED WITH BLANW: SEVERAL DISORDERS APPEAR	120
E: EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD: A SLIGHT PARAKERATOSIS IS OBSERVED.....	120

FIGURE 35. IMMUNOSTAINING OF LAMININ-5 AT 9/10 DAYS.....	121
A: EXPRESSION OF THE UNTREATED SKIN EXPLANT (CONTROL)	121
B: EXPLANT TREATED WITH ORGONW: NO CHANGE COMPARED WITH THE CONTROL, T.....	121
C: EXPLANT TREATED WITH NACRW: STRONG STIMULATION OF THE EXPRESSION OF LAMININ-5.....	121
D: EXPLANT TREATED WITH BLANW: INCREASE OF THE EXPRESSION OF LAMININ-5.....	121
E: EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD: INCREASE OF THE EXPRESSION OF LAMININ-5	121
FIGURE 36. BLUE-ALCIAN P.A.S. COLORATION OF GAGS AT 9/10 DAYS.	122
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	122
B : EXPLANT TREATED WITH ORGONW : WE OBSERVE A PINK/ PURPLE BAND OF NEUTRAL GAGS, QUITE REGULAR AND FAIRLY THICK ALONG THE DEJ.....	122
C : EXPLANT TREATED WITH THE NACRE OF PINCTADA MARGARITIFERA, NACRW: VERY SLIGHT PRODUCTION OF NEUTRAL GAGS	122
D : EXPLANT TREATED WITH BLANW, WE OBSERVE A PINK/ PURPLE BAND, QUITE REGULAR AND FAIRLY THICK ALONG THE DEJ REPRESENTING THE STIMULATION OF THE PRODUCTION OF NEUTRAL GAGS	122
E : EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD : THE SAME PINK/ PURPLE BAND APPEARS REPRESENTING THE STIMULATION OF THE PRODUCTION OF NEUTRAL GAGS.....	122
THERE IS NO STIMULATION OF THE PRODUCTION OF ACID GAGS.	122
FIGURE 37. IMMUNOSTAINING OF COLLAGEN TYPE IV AT 9/10 DAYS.....	123
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	123
B : EXPLANT TREATED WITH ORGONW: STIMULATION OF COLLAGEN IV PRODUCTION	123
C : EXPLANT TREATED WITH NACRW: STIMULATION OF COLLAGEN IV PRODUCTION	123
D : EXPLANT TREATED WITH THE MINERAL FRACTION, BLANW : STRONG STIMULATION OF THE COLLAGEN IV PRODUCTION ALONG THE DEJ, IN THE DERMIS AND IN THE BASEMENT MEMBRANE	123
E : EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD: STIMULATION OF COLLAGEN IV PRODUCTION ...	123
FIGURE 38. IMMUNOSTAINING OF COLLAGEN TYPE I AT 9/10 DAYS.....	124
A: UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	124
B : EXPLANT TREATED WITH ORGONW: STAINING UNCHANGED COMPARED WITH THE CONTROL T.	124
C : EXPLANT TREATED WITH NACRW: THE PRODUCTION OF COLLAGEN I IS MARKEDLY STIMULATED BY THIS EXTRACT	124
D : EXPLANT TREATED WITH THE MINERAL FRACTION, BLANW: SLIGHT STIMULATION OF THE PRODUCTION OF COLLAGEN I.....	124
E : EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD: THE MOST IMPORTANT STIMULATION.....	124
FIGURE 39. IMMUNOSTAINING OF TYPE III COLLAGEN AT 9/10 DAYS.....	125
A : UNTREATED EXPLANT (CONTROL)	125
B : EXPLANT TREATED WITH ORGONW: THE PRODUCTION REMAINS UNCHANGED COMPARED WITH THE CONTROL.....	125

C : EXPLANT TREATED WITH NACRW : A STIMULATION OF COLLAGEN III PRODUCTION IS OBSERVED.	125
D : EXPLANT TREATED WITH THE MINERAL FRACTION, BLANW : THE PRODUCTION REMAINS UNCHANGED COMPARED WITH THE CONTROL.	125
E : EXPLANT TREATED WITH ORGONWAD : A STIMULATION OF COLLAGEN III PRODUCTION IS OBSERVED.	125
FIGURE 40. RELATION COUPLEE ET RECIPROQUE ENTRE LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET L'EXPRESSION DES GENES DE LA DIFFERENCIATION (STEIN ET LIAN, 1993). COLI : COLLAGÈNE; PAL: ACTIVITÉ PHOSPHATASE ALCALINE; OP: OSTÉOPONTINE; OC: OSTÉOCALCINE	134
FIGURE 41. LES DIFFERENTS PROTOCOLES D'EXTRACTION.	137
FIGURE 42. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES FIBROBLASTES EN REPONSE AU CONTROLE NEGATIF (A) ET AU CONTROLE POSITIF, LA DEXAMETHASONE (B).....	142
FIGURE 43. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES FIBROBLASTES EN REPONSE AU BLANW (A) ET AU BLANE (B).	142
FIGURE 44. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES FIBROBLASTES EN REPONSE A L'EXTRAIT ORGONW A 239µG DE PROTEINES/ML (A), 774µG DE PROTEINES/ML (B) ET 1200µG DE PROTEINES/ML (C).....	143
FIGURE 45. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES FIBROBLASTES EN REPONSE A L'EXTRAIT ORGONED A 388µG DE PROTEINES/ML (A), 969µG DE PROTEINES/ML (B) ET 1000µG DE PROTEINES/ML (C).....	143
FIGURE 46. RESULTATS DES TESTS DE MINERALISATION MENES SUR LES PRE-OSTEOBLASTES MC3T3-E1 AVEC L'EXTRAIT ORGONE AUX DIFFERENTES CONCENTRATIONS A J3, J6, J9, J12 ET J15 (B). LA POSITION DES DIFFERENTS EXTRAITS EST INDIQUEE (A).....	146
FIGURE 47. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES, D1 ORL UVA, EN REPONSE AU CONTROLE NEGATIF , DE L'EAU MILLIQ (A) ET AU CONTROLE POSITIF, LA DEXAMETHASONE (B).....	148
FIGURE 48. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES, D1 ORL UVA, EN REPONSE AU BLANW (A) ET AU BLANE (B).	149
FIGURE 49. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DU TAUX DE COLLAGENE TOTAL (TYPE I A IV) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES, D1 ORL UVA, EN REPONSE AU BLANW (A) ET AU BLANE (B).	149
FIGURE 50. EVOLUTION DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES DIFFERENTS EXTRAITS : ORGONW (A), ORGONWAD (B) ET ORGONE (C) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES, D1 ORL UVA.....	150
FIGURE 51. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ACTIVITE PAL (HISTOGRAMME) ET DE LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES (COURBE) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES EN REPONSE A L'EXTRAIT ORGONE A 26µG DE PROTEINES/ML (A), 136µG DE PROTEINES/ML (B) , 495µG DE PROTEINES/ML (C) ET 915µG DE PROTEINES/ML (D).	151

FIGURE 52. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DU TAUX DE COLLAGENE TOTAL (TYPE I A IV) DES CELLULES STROMALES PLURIPOTENTES EN REPONSE A L'EXTRAIT ORGONE A 26µG DE PROTEINES/ML (A), 136µG DE PROTEINES/ML (B) , 495G DE PROTEINES/ML (C) ET 915µG DE PROTEINES/ML (D).	152
FIGURE 53. RESULTATS DES TESTS DE MINERALISATION MENES SUR LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES DE SOURIS, D1 ORL UVA, AVEC L'EXTRAIT ORGONE AUX DIFFERENTES CONCENTRATIONS A J3, J6, J9, J12 ET J15 (B). LA POSITION DES DIFFERENTS EXTRAITS EST INDIQUEE (A).	153
FIGURE 54. COLORATION DE VON KOSSA + ROUGE D'ALIZARINE DES DEPOTS MINERALISES OBTENUS AVEC LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES DE SOURIS, D1 ORL UVA, AVEC L'EXTRAIT ORGONE AUX DIFFERENTES CONCENTRATIONS A J6. EN NOIR LES DEPOTS MINERALISES, EN ROUGE, LES OSTEOLASTES	154
FIGURE 55. SPECTRE IRTF CORRESPONDANT AU DEPOT MINERALISE OBTENU APRES AJOUT DE L'EXTRAIT ORGONE[915] A J15.	156

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 1. COMPOSITION OF MAJOR, MINOR AND TRACE ELEMENTS IN ORGON U, A SHELL OF REQUIENIA AMMONIA AND THE CONTROL SAMPLE (PINCTADA MARGARITIFERA MOTHER OF PEARL LAYER) ANALYZED BY ICP-AES.FOR COMPARISON, THE ANALYSIS OF A RUDIST SHELL IS GIVEN (STUEBER AND RAUCH, 2005).N.D. MEANS NON DETECTED AND N.M. NOT MEASURED.	60
TABLE 2. CONCENTRATION IN GLOBAL ORGANIC MATTER, CaCO ₃ AND SALT OF DIALYZED AND NOT DIALYZED SAMPLES. *THE CONTENT OF GLOBAL ORGANIC MATTER IS OBTAINED BY MULTIPLYING THE TOC CONTENT BY 2.5 **THE SALT PERCENTAGE IS OBTAINED BY SUBTRACTION OF ORGANIC AND CaCO ₃ PERCENTAGE. ***ORGONAI CONTAINS INSOLUBLE MINERALS.	82
TABLE 3. ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY ANALYSES OF FOUR EXTRACTS (ORGONW, ORGONE, ORGONAS, ORGONAI). NACREW IS USED AS A POSITIVE CONTROL. *INDICATES THAT THE MEASURED VALUE IS BELOW THE DETECTION LIMIT OF THE APPARATUS	82
TABLE 4. PROTEIN CONTENTS OF THREE DIALYZED SAMPLES DETERMINED BY BCA TEST. STD DEV= STANDARD DEVIATION.....	88
TABLEAU 5. ENSEMBLE DES ACTIVITES DES EXTRAITS TESTES. LES FLECHES REPRESENTENT LES VARIATIONS PAR RAPPORT A L'EXPLANT TEMOIN NON TRAITE. EN ROUGE SONT INDIQUES LES EFFETS DES EXTRAITS D'ORGON.....	164

Introduction Générale

Les tissus minéralisés, et notamment les coquilles de mollusques, ont suscité un grand intérêt dans le domaine des biomatériaux en raison de leurs propriétés mécaniques exceptionnelles : entre autres, leur volume de fraction minérale élevé, leur grande dureté et leurs propriétés anisotropes. L'étude de ces processus de biominéralisation permet aujourd'hui de développer des applications dans les domaines du biomédical, de la cosmétique et de la nutraceutique. La nacre est un de ces tissus minéralisés, parmi les plus étudiés avec l'os. Elle a conservé dans sa structure des molécules dites « signal » reconnues par les cellules de la peau et de l'os. Elles peuvent non seulement stimuler certains mécanismes mais aussi assurer leur régulation. En effet, l'équipe MNHN/CNRS a démontré une activité de la nacre sur la stimulation des cellules formatrices d'os y compris sur les cellules souches pour réparer ou entretenir ce tissu mais aussi aboutir à la formation finale de tissus physiologiquement sains et actifs. Il a été démontré une parfaite ostéointégration de la nacre en plus de son pouvoir ostéoinducteur et ostéogénique. La compatibilité de molécules signal provenant de la nacre avec les cellules mammaliennes impliquées dans l'ostéogénèse constituent des indices forts en faveur de la conservation moléculaire des signaux de contrôle des biominéralisations (Milet *et al.*, 2004). Ce résultat suggère que la machinerie complexe de la biominéralisation chez les mammifères et chez les mollusques partage des structures communes leur permettant de franchir la barrière du système de défense immunitaire et d'activer les cellules d'un autre organisme (Pereira-Mouries, 2003). Plus récemment, il a été découvert que des molécules protéiques mais aussi lipidiques agissent sur les cellules cutanées à différents niveaux et notamment sur les fibroblastes dermiques mais aussi sur les cellules germinales souches des cellules épidermiques, et contribuent ainsi à réguler de façon optimale la stratification épidermique, source de bonne santé cutanée.

Ce travail s'inscrit dans une nouvelle thématique environnementale s'intéressant aux relations existantes entre « Environnement, Géochimie et Santé ». La Provence possédait au Crétacé il y a 120 millions d'années, un rivage tropical bordé d'une barrière récifale où se sont accumulés des biocalcaires d'une grande pureté. L'étude porte sur ces bancs de fossiles plus particulièrement celui de la carrière d'Orgon (Bouches-du-Rhône). Ce massif est essentiellement constitué de rudistes, bivalves producteurs de plateformes carbonatées, ayant vécu au Crétacé, et dont la coquille est issue de la biominéralisation. Il s'agit d'un assemblage de coquilles de rudistes plus ou moins petites et épaisses associées à des grainstones. C'est

une calcite naturelle parmi les plus pures au monde : plus de 99.5%. Le reste, environ 0.5% est en fait constitué par de la kaolinite (une argile), des éléments traces comme le silicium et le magnésium ainsi que par les molécules organiques de la matrice calcifiante occluses dans les fossiles à l'origine du gisement. Les calcaires biogéniques de plateforme possèdent un excellent potentiel pour produire, conserver et stocker les molécules organiques fossiles authigènes associées à la biominéralisation calcaire. En effet, de nombreuses études ont démontré que les rudistes, grâce à leur coquille compacte et épaisse possédaient un haut degré de stabilité face à la diagénèse (Al-Aasm & Veizer, 1986; Hall and Kennedy, 1967; Steuber, 1999). Aujourd'hui, que reste t-il de la matrice organique qui a assuré le transport et la minéralisation du calcium de ces biocalcaires?

Intégrés au sédiment, les éléments squelettiques et la matière organique subissent et enregistrent les processus diagénétiques et taphonomiques en même temps que le sédiment, ce qui peut altérer les signaux biologiques. Des études ont donc été menées pour évaluer l'état de préservation de la matière organique de ce calcaire à faciès Urgonien aux marges du bassin Vocontien. A l'origine, ces rudistes possédaient une coquille composée d'une couche interne aragonitique et une couche externe calcitique à faible teneur en magnésium (LMC) (Al-Aasm et Veizer, 1986 ; Steuber and Rauch, 2005). Le but de ce travail consistera tout d'abord à démontrer que ces molécules organiques ont bien été préservées, ceci malgré la diagénèse subie. Ensuite, il s'agira de caractériser ces molécules et d'évaluer leur état de préservation. Pour cela, nous avons alors expérimenté plusieurs modes opératoires afin d'extraire et de caractériser ces molécules organiques. Quatre protocoles d'extraction ont donc été élaborés dans le but d'extraire les molécules dans le meilleur état de conservation possible et avec le meilleur rendement quantitatif. Il s'agira ensuite d'étudier les matrices de biominéralisation fossiles des calcaires bioconstruits et de montrer qu'elles peuvent, tout comme il a été démontré dans le cas de la nacre actuelle, être reconnues par les cellules humaines. Deux axes d'études principaux sont visés : d'une part la peau et ses cellules telles que les fibroblastes du derme ou les kératinocytes de l'épiderme, et d'autre part, l'os et ses cellules telles que les ostéoblastes ou les cellules souches. Le but final étant de pouvoir valoriser ces molécules de biominéralisation fossiles pour la pharmaceutique et/ou la cosmétique.

CHAPITRE I :

Revue Bibliographique

I.1. Importance du Calcium dans l'organisme

I.1.1. Le calcium

Le calcium est le cinquième élément le plus abondant de la croûte terrestre (plus de 3 %). C'est également le cinquième élément du corps humain où il se concentre à plus de 99% dans les os et les dents, soit 1% à 2% du poids corporel d'un adulte. Il est principalement sous forme d'hydroxyapatite dont la formule est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dans ce cas, il assure des fonctions de renfort mécanique aux tissus de soutien et aux tissus spécialisés (os, dent, tendon, etc.). Ces tissus résultent du processus de biominéralisation par lequel la vie contrôle la croissance minérale des biocristaux.

Le calcium est très important pour beaucoup d'autres fonctions de notre organisme : il joue le rôle de second messager primordial pour l'ensemble des cellules eucaryotes (Berridge *et al.*, 1999, 2000) ; par exemple il contrôle l'activation et la prolifération des lymphocytes (Lewis and Cahalan, 1995; Racioppi and Means, 2008). Il est également l'élément clef de la régulation du mécanisme assurant la contraction des muscles (dont le cœur) : en effet, l'arrivée d'un potentiel d'action musculaire au niveau des structures spécialisées d'un muscle permet la libération du calcium dans le cytoplasme. Le calcium vient alors se fixer permettant l'activation de la mise en place des ponts actine-myosine qui sont à l'origine de la contraction. Enfin, lors de la relaxation musculaire, le calcium est réabsorbé à l'aide d'une molécule d'ATP. La diminution de la concentration en calcium est donc à l'origine de la relaxation.

Il aide également dans la transmission de l'influx nerveux : en effet, lors de l'arrivée du potentiel d'action au niveau de la synapse, le changement de polarité déclenche l'ouverture des canaux calcium membranaires voltage-dépendants et ainsi l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cet événement permet la fusion des vésicules avec la membrane plasmique et ainsi la libération des neurotransmetteurs dans l'espace intersynaptique. Le calcium est donc à l'origine du phénomène d'exocytose qui permet la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses. La concentration intracellulaire en calcium permet, par ce même mécanisme, la sécrétion glandulaire. Il possède également un rôle dans la modulation de l'activité de diverses enzymes et active par exemple diverses protéines kinases. De plus, au cours de nombreuses études, il a été démontré que le calcium

pouvait contribuer à maintenir une tension artérielle normale et ainsi protéger le système cardiovasculaire (Cappuccio *et al.*, 2000). Enfin, la mitochondrie est au cœur du métabolisme énergétique cellulaire étant le lieu de production des molécules d'ATP ; le calcium est encore ici un régulateur clef de la fonction mitochondriale puisqu'il agit à plusieurs niveaux au sein de l'organite afin de stimuler la synthèse d'ATP (Brookes *et al.*, 2004).

I.1.2. L'Homéostasie du calcium

L'homéostasie permet de maintenir la concentration en calcium libre dans des limites étroites dans le liquide extracellulaire. Les acteurs principaux de ce contrôle sont 3 organes : l'intestin, les reins et les os, qui servent d'intermédiaire en libérant le calcium et le phosphate dans le sang grâce aux ostéoclastes, et 3 hormones : la parathormone (hormone parathyroïdienne ou PTH), la vitamine D (plus précisément le 1,25-dihydroxycholecalciférol) et la calcitonine (Deftos, 2002).

Le calcium diététique atteint le squelette en étant absorbé par le système gastro-intestinal : environ 10-40% est en effet absorbé par l'intestin grêle, ceci grâce à la vitamine D (Sommer, 1995; Mahan and Escott-Stump, 1996). Il entre ensuite dans le fluide extracellulaire et est incorporé au squelette grâce au processus de minéralisation. Le calcium contenu dans le fluide extracellulaire est filtré par les reins où jusqu'à 98 % du minéral est réabsorbé. Les reins sont primordiaux pour l'homéostasie du calcium et permettent la réabsorption du système tubulaire vers le sang ou l'excrétion dans l'urine (Bowen, 2003).

Le maintien des concentrations en calcium et en phosphore dans le sang est maîtrisé par une action concertée de 3 hormones qui contrôlent les échanges de calcium vers le sang et le fluide extracellulaire (Heaney, 2003). Ces 3 hormones et organes permettent de maintenir la concentration de calcium à un taux optimum qui favorise les fonctions physiologiques nécessitant ce minéral telles que la transmission neuronale ou la contraction musculaire. L'hormone parathyroïdienne permet d'augmenter les concentrations de calcium dans le sang en facilitant la mobilisation du calcium de l'os et en maximisant la réabsorption tubulaire du calcium par le rein. Ces actions résultent en une perte minimale du calcium dans l'urine. D'autre part, la vitamine D agit aussi en accroissant les concentrations en calcium dans le sang. L'effet le plus important de cette hormone est de faciliter l'absorption du calcium par l'intestin grêle. Conjointement avec l'hormone parathyroïdienne, elle améliore les flux de calcium en dehors de l'os. Enfin, la calcitonine a une fonction inverse et permet de réduire les

concentrations de calcium dans le sang : elle permet de limiter la réabsorption rénale tubulaire du calcium, i.e. elle favorise l'excrétion du calcium dans l'urine (Bowen, 2003). Ainsi une concentration trop faible en calcium va être suivie d'une augmentation de la sécrétion de l'hormone. En plus de ces hormones, d'autres telles que les cytokines et les facteurs de croissance jouent également un rôle important dans le métabolisme du calcium.

I.1.3. Les tissus de soutien

I.1.3.1 La peau

Organisation structurale

La peau est un organe vital qui constitue l'enveloppe corporelle assurant l'interface physique avec le milieu extérieur. C'est le plus gros organe de l'être humain, représentant 1/3 du poids de l'organisme et une surface de l'ordre de 2 m² chez un adulte (Prost-Squarcioni *et al.*, 2005). Elle possède de nombreux rôles tels que la protection contre les agressions mécaniques et les radiations lumineuses. Elle est également le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions respiratoires, immunitaires et thermorégulatrices. Elle permet également la réception des informations sensibles et évite la déshydratation de l'organisme (Prost-Squarcioni *et al.*, 2005).

La structure de la peau est complexe. Elle comprend, avec ses annexes, tous les tissus histologiques, sauf les tissus osseux et cartilagineux. Elle se subdivise en 4 régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme. L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau. Il est composé à 90% de kératinocytes, cellules qui forment un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé. L'épiderme est en constant renouvellement : en effet, les cellules souches qui adhèrent à la lame basale produisent des kératinocytes qui vont ensuite migrer vers la surface de l'épiderme en se kératinisant. Ces kératinocytes formeront la couche cornée, constituée de cornéocytes, i.e. des cellules mortes anucléées et aplaties qui desquament à la surface de la peau. Ce processus nécessite la traversée des différentes couches de l'épiderme, i.e. la couche basale, la couche épineuse, la couche granulaire et la couche cornée elle-même (figure 1). Cela dure environ 21 à 28 jours (Storey and Leblond, 1951).

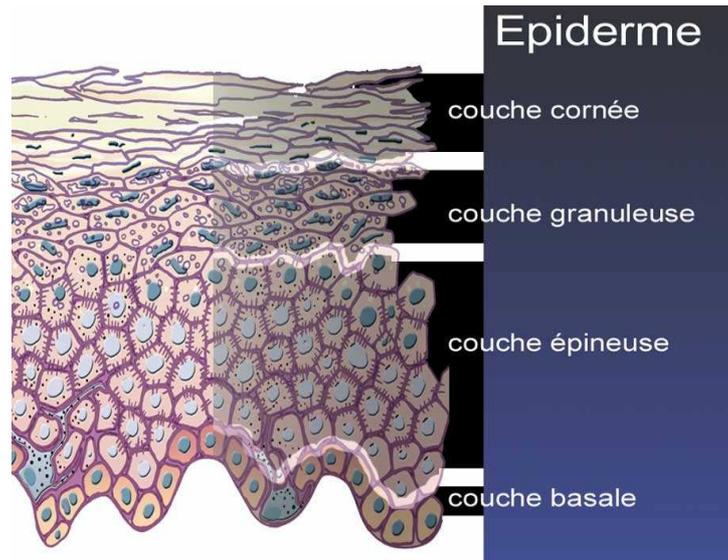


Figure 1. Epiderme avec ses différentes couches.

D'autres cellules constituent également l'épiderme lui conférant ainsi des propriétés biologiques : les mélanocytes, responsables de la pigmentation de la peau, les cellules de Langerhans, cellules dendritiques capables de déclencher une réaction immunitaire et les cellules de Merkel qui jouent le rôle de mécanorécepteurs.

La maturation des kératinocytes, composée des phases de prolifération et de différenciation, s'accompagne de l'expression de divers marqueurs. Les kératines, protéines de structure du cytosquelette du kératinocytes, sont les principaux marqueurs des différents stades de maturation de ces cellules dans l'épiderme. Les intégrines, par exemple, sont des protéines transmembranaires impliquées dans le contrôle et l'initiation de la différenciation (Clark and Brugge, 1995 ; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Enfin, lorsque les kératinocytes atteignent la couche granuleuse, de nouvelles protéines sont synthétisées afin de participer à la différenciation terminale : c'est le cas de la loricrine qui permet la formation de l'enveloppe cornée (Mehrel *et al.*, 1990).

L'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique (JDE). Elle joue un rôle fondamental comme support mécanique de l'épiderme, contrôle les échanges de produits métaboliques entre les deux compartiments et laisse traverser divers types cellulaires lors des processus immunologiques. Elle adhère au derme et à l'épiderme grâce à la présence de fibres d'ancrage, qui lui permettent de résister aux différentes contraintes. Parmi celles-ci, la laminine-5 ; c'est la protéine majeure qui assume un rôle structural et qui participe au

maintien de la cohésion cutanée (Aumailley and Krieg, 1996). Cependant la JDE est également constituée de collagènes type IV et type VII, de glycoprotéines, telles que les fibronectines, et de protéoglycanes (Hisher and Voorhees, 1996). L'ensemble de ces macromolécules sont liées les unes aux autres formant ainsi un réseau tridimensionnel (Aumailley and Rousselle, 1999).

Le derme est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique. Il s'adapte aux mouvements des structures situées en-dessous et joue un rôle fondamental dans la nutrition de l'épiderme de part son important réseau vasculaire: il permet ainsi son développement et sa croissance (Coulomb *et al.*, 1989) ainsi que sa différenciation (Le Panse *et al.*, 1996). Il est composé d'une matrice extracellulaire détaillée ci-dessous. Le derme s'organise en deux couches qui sont d'une part le derme papillaire ou superficiel qui se situe entre les crêtes de l'épiderme formant ainsi les papilles dermiques et d'autre part, le derme réticulaire ou profond.

La matrice extracellulaire (MEC) est constituée de collagènes type I et type III et d'élastine lesquelles molécules sont synthétisées par les fibroblastes dermaux. L'ensemble baigne dans une substance fondamentale dite « amorphe » constituée de glycoprotéines de structure (laminine, fibronectine, etc), de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes, qui permettent l'hydratation de la peau (exemple de l'acide hyaluronique). Ces macromolécules sont sécrétées dans l'espace extracellulaire où elles forment un réseau tridimensionnel. Les principales molécules composant la MEC sont décrites ci-dessous :

-Les collagènes

Ils représentent 30% des protéines de l'organisme humain. Ce sont des molécules structurales de la MEC qui comportent un ou plusieurs domaines ayant une structure en triple hélice (Van der Rest *et al.*, 1991). Dans le derme, on retrouve les collagènes type I, III, V, VI, XII et XIV. Le collagène IV est le constituant majeur des lames basales. Tandis que les collagènes I et III sont des collagènes fibrillaires que l'on retrouve essentiellement dans le tissu conjonctif du derme. Les autres collagènes ne seront pas étudiés dans ce manuscrit.

-Les fibres élastiques

Ces fibres sont à l'origine de l'élasticité de la peau. Elles sont composées de deux éléments bien distincts qui sont l'élastine, élément amorphe, ainsi qu'un composant microfibrillaire de nature glycoprotéique. Sécrétée par les fibroblastes, l'élastine est une molécule majeure du derme. Cependant, sa synthèse diminue avec l'âge et l'élastine se trouve remplacée par du collagène inextensible.

-Les glycosaminoglycanes (GAG)

Il existe deux types de GAGs ; les neutres, qui servent de réservoirs de croissance, et les acides, représentés essentiellement par l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique (ou hyaluronanne) est le principal GAG du derme ; c'est le seul GAG non sulfaté. Ce polysaccharide est synthétisé en continu par les fibroblastes et assure l'hydratation du tissu conjonctif et donc la souplesse du derme. Cependant, avec l'âge, sa production diminue (Meyer *et al.*, 1934).

-Les protéoglycanes

Un protéoglycane est la combinaison d'une protéine et d'un glycosaminoglycane. Ce sont des molécules remarquables du fait de leur double nature biochimique. De ce fait, elles entrent dans un nombre considérable de structures et de réactions dans la MEC. Tout comme les GAGs, ils sont sécrétés par les fibroblastes.

-Les glycoprotéines de structure

Parmi les glycoprotéines de structure présentes dans la MEC, on s'intéressera dans cette étude aux laminines et plus particulièrement à la laminine-5. C'est un composant essentiel de la lame basale. Elle se lie au collagène VII pour assurer la cohésion entre le derme et l'épiderme (Rousselle *et al.*, 1997).

La dernière couche de la peau est l'hypoderme. C'est un tissu sous-cutané conjonctif lâche, richement vascularisé et innervé. Il est composé d'adipocytes riches en triglycérides et en acides gras mais on retrouve également des fibroblastes, des dendrocytes (cellules nerveuses), des mastocytes (cellules appartenant au système immunitaire) ainsi que la partie profonde des annexes dermo-épidermiques. Ce tissu joue le rôle de réserve énergétique et de protection mécanique et thermique (Kanitakis, 1995).

I.1.3.2. Les os

L'os est un tissu conjonctif solidifié composé d'une phase minérale et d'une matrice organique. La phase minérale représente les 2/3 du poids de l'os et son composant majoritaire est l'hydroxyapatite, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ mais on retrouve aussi des cristaux amorphes de phosphate de calcium ou de carbonate de calcium. Le tiers du poids restant étant la matrice organique c'est-à-dire du collagène type I essentiellement mais aussi diverses protéines, l'ensemble étant produit par les ostéoblastes (Hill, 1998). Cette association de phase organique crée une structure dans laquelle les cristaux d'hydroxyapatite viennent minéraliser. La croissance minérale qui est elle aussi sous le contrôle de la matrice organique est le processus de biominéralisation.

Les os supportent les structures corporelles, protègent les organes internes et, en conjonction avec les muscles, facilitent le mouvement. Ils sont également impliqués dans la formation des cellules sanguines, le métabolisme du calcium, et le stockage de minéraux. Ils jouent enfin un rôle dans la détoxification de l'organisme en fixant et stockant par exemple le plomb. Il existe trois types d'os : long, court et plat. Pour tous types on distingue la partie centrale, riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins, et une partie périphérique beaucoup plus dure et très résistante. Ils sont entourés d'une fine enveloppe conjonctive, le périoste, qui contribue à l'innervation, la croissance et à la cicatrisation.

Pour assurer ces fonctions, le tissu osseux est continuellement renouvelé par un processus de remodelage assuré par deux types cellulaires : les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice. L'os est ainsi formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage, mobiles et progressant dans le tissu osseux (Hill, 1998). Ce processus est complexe et nécessite l'interaction entre différents types cellulaires, eux-mêmes régulés par de nombreux facteurs mécaniques et biochimiques.

Le cycle de remodelage débute par une phase d'activation, caractérisée par la différenciation des ostéoclastes. Les ostéoblastes sont indispensables à la mise en place du programme de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en préostéoclastes puis en ostéoclastes et enfin en ostéoclastes actifs. Puis cette phase d'activation est suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes mûrs. Chaque ostéoclaste devenu actif se fixe à la matrice sur le lieu de résorption et la phase de résorption de la matrice commence. Elle s'effectue en deux étapes successives : 1) dissolution de la phase minérale par acidification du compartiment de

résorption, 2) dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent, meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune. Les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes mûrs qui synthétisent et déposent une nouvelle matrice qui comble la lacune de résorption. Ceci s'effectue en 2 temps : production de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes puis minéralisation de cette matrice.

I.1.4. Le rôle physiologique du calcium dans les tissus de soutien

I.1.4.1. Le rôle du calcium dans la peau

Dans la peau, Hara *et al.* (1993) ont montré de nombreuses altérations morphologiques de la peau liées à l'âge, qu'ils expliquent par la perte du gradient de calcium qui existe dans la peau. Forslind *et al.* (1999) ont en effet observé une distribution anormalement éparse du calcium tout au long de l'épiderme chez les sujets âgés et non plus le gradient qui existe avec une couche basale contenant peu de Ca^{2+} et une couche granulaire au contenu important (Malmquist *et al.*, 1984; Menon *et al.*, 1985). Ce gradient de calcium intervient en effet dans la formation de l'enveloppe cornée (Nemes and Steinert, 1999), dans la synthèse des lipides épidermiques (Watanabe *et al.*, 1998) et il induit la différenciation terminale des kératinocytes (Watt, 1989, Hennings *et al.*, 1980; Yuspa *et al.*, 1989). Le mécanisme par lequel ce gradient est maintenu reste flou mais il est admis que la perte de ce gradient affecte l'exocytose des corps lamellaires (Menon *et al.*, 1994) et entraîne une prolifération incontrôlée provoquant des maladies telles que le psoriasis (Menon and Elias, 1991).

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, le vieillissement de la peau est l'un des signes les plus visibles du processus d'involution humaine. Ce n'est plus seulement un problème d'ordre cosmétique mais bien une défaillance fonctionnelle d'un organe autrement dit une affection médicale (Kaya, 2008). Ces fragilités chroniques cutanées et les affections liées sont regroupées sous le nom générique de dermatoses. On comprend bien ceci en observant la figure 2 qui nous montre deux coupes histologiques, l'une provenant d'une peau jeune, et la seconde provenant d'une peau mature. On constate clairement un amincissement de l'épiderme avec l'âge, ainsi qu'un derme beaucoup moins dense en constituants organiques.

De plus, la jonction dermo-épidermique (JDE) est aplatie ; tous ces signes transparaissent par une peau ridée qui a perdu son éclat et plus susceptible aux maladies cutanées.

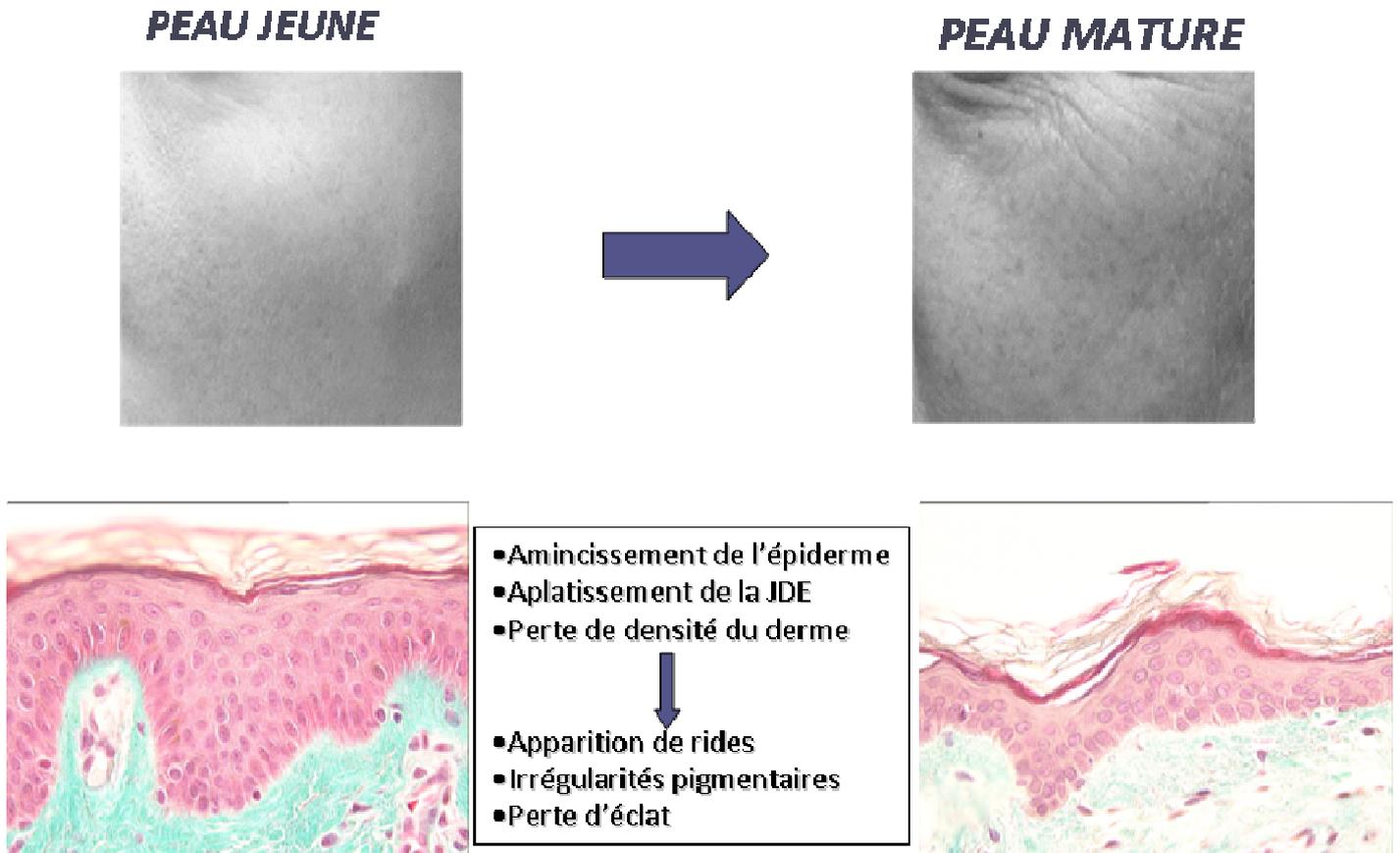


Figure 2. Différences de morphologie du derme et de l'épiderme selon l'âge de la peau (source : LVMH¹)

I.1.4.2. Le calcium et la physiologie de l'os

La fonction métabolique de l'os est de fournir un réservoir de minéraux ; avant tout le calcium mais également du magnésium, du phosphore, ...Il existe 3 réservoirs de calcium dans le corps humain (Bowen, 2003) :

¹ André P (2008). « De la cosmétique au Développement durable », pdf disponible en ligne: <http://glucidoc.2008.free.fr/PPT/Oui/Andre.pdf>

- 1) Le calcium intracellulaire: Il est localisé essentiellement dans les mitochondries ainsi que dans le réticulum endoplasmique. Ses concentrations fluctuent et sont intrinsèques au rôle du calcium dans la contraction musculaire, l'activation d'enzymes et autres...
- 2) Le calcium localisé dans le sang et dans le fluide extracellulaire : Approximativement 40% de calcium dans le plasma est lié aux protéines, principalement albumine ; environ 50% de calcium dans le plasma est du calcium ionique diffusible et environ 10% est diffusible, mais est complexé avec des anions tels que le phosphate et le citrate (Walser, 1961).
- 3) Le calcium des os : Le réservoir de calcium le plus important est l'os. Le squelette a en effet une condition structurale évidente pour le calcium. Dans l'os, 99% du calcium est attaché à la phase minérale mais le 1% restant est un réservoir qui peut facilement être échangé avec le calcium extracellulaire. Le corps peut donc emprunter du calcium au squelette lorsque le niveau de calcium dans le sang est trop bas et inversement. Le calcium peut entrer ou quitter le squelette selon 3 moyens : par échange ionique, par dissolution/précipitation du minéral ou par formation/résorption des os.

Tout comme la peau, avec l'âge, il a été constaté une fragilité excessive du squelette due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de la microarchitecture osseuse. Les mécanismes impliqués dans la perte osseuse avec l'âge et la ménopause sont maintenant mieux connus : la capacité de remplacement de la matrice osseuse par les ostéoblastes diminue ce qui induit un déficit de dépôt de matrice et un amincissement des travées osseuses (Duboeuf *et al.*, 1991). Une déficience en calcium et le vieillissement du squelette d'une part et une déficience en œstrogènes à la ménopause d'autre part implique une diminution de la densité osseuse (Raisz, 2005).

Cette maladie généralisée du squelette est appelé ostéopénie ou « ostéoporose ». C'est une maladie fréquente chez les femmes après la ménopause car la masse osseuse diminue avec l'âge et avec la carence en hormones féminines (œstrogènes). Elle est considérée comme un enjeu de santé publique en raison de sa fréquence et des conséquences potentiellement graves des fractures dont elle augmente le risque (10 000 morts et 170 000 fractures par an en France). Le diagnostic de l'ostéoporose repose sur la mesure de la densité minérale osseuse et de nombreuses études démontrent qu'une supplémentation quotidienne en calcium peut

réduire les risques de fractures (Lips, 2001, Nieves, 2005, Prince *et al.*, 2006). Ces suppléments permettraient de couvrir d'une part, les pertes obligatoires qui sont de l'ordre de 150 à 300 mg/j et les variations des échanges entre os et Ca^{2+} sanguin qui sont dépendants de périodes d'accrétion osseuse maximum et des pertes liées à la grossesse, à l'allaitement, et à la carence estrogénique (Cormier, 2006).

Il y a donc beaucoup à apprendre pour notre santé sur l'utilisation du calcium en tant que principe actif. Dans ce travail nous montrons que le calcium constitue une source d'actifs pour les tissus de soutien, que sont l'os et la peau, s'il est associé aux molécules organiques compétentes de biominéralisation, comme celles extraites des biocalcaires.

I.1.5. Le calcium et la pharmacopée

I.1.5.1. En pharmaceutique

Le calcium (Ca) est primordial. Non seulement pour le développement des os mais également pour de nombreux processus chimiques et régulateurs. Il nécessite d'autres nutriments et micronutriments afin de fournir un effet bénéfique maximal dans le corps humain (Kass-Wolff, 2004). Il existe différents médicaments basés sur les formes les mieux assimilables pour suppléer les différentes carences connues chez l'homme. Le calcium est utilisé en cas de besoins accrus en période de croissance, de grossesse, d'allaitement, ou de décalcification osseuse : l'ostéoporose. On utilise beaucoup le carbonate de calcium pour cette supplémentation en Ca, seul ou associé à la vitamine D pour une meilleure assimilation et fixation (Lips, 2001; Nieves, 2005; Prince *et al.*, 2006). Le traitement de cette maladie est un enjeu majeur sur le marché de la pharmacologie puisqu'avec une population de plus en plus vieillissante, Kass-Wolff (2004) a estimé que dans les 20 prochaines années, 41 millions de femmes dans le monde seront atteintes d'ostéoporose.

C'est pourquoi les chercheurs ont récemment étudiés les coraux, composés de carbonate de calcium, afin de régénérer l'os (Vuola *et al.*, 2002). En effet, Hervé Petite et son équipe (2000) ont travaillé sur ce biomatériau pour la reconstruction de pertes osseuses massives. Il est facilement résorbable au cours du temps; présente une bonne résistance à la compression; un réseau de pores connectés les uns aux autres, où les vaisseaux sanguins peuvent pénétrer

facilement ainsi qu'une assez bonne tolérance par le système immunitaire de l'homme. Il est cependant de moins en moins utilisé pour des raisons de décontamination, on lui préfère la nacre.

Le calcium a également une activité anticarcinogène : un certain nombre d'études suggèrent qu'il peut réduire le risque de cancer colorectal (Flood *et al.*, 2005). En effet, les ions calcium pourraient précipiter avec les acides biliaires libres et les acides gras libres abaissant ainsi leur concentration et donc leur cytotoxicité. Dans la même logique, le calcium est associé au carbonate comme tampon gastrique associé à d'autres antiacides d'action locale. Ces associations neutralisent les acides sécrétés par l'estomac et sont utilisées dans le traitement des aigreurs, brûlures d'estomac et remontées acides. De plus, le calcium diététique complété de vitamine D pourrait avoir une action protectrice contre le cancer du sein (Lin *et al.*, 2007 ; Lappe *et al.*, 2007).

La supplémentation en calcium s'est avérée avoir un effet sur la réduction de la tension artérielle systolique. En effet, au cours de nombreuses études, on a constaté l'existence d'un lien, encore mal compris, entre l'hypertension artérielle et un mauvais métabolisme du calcium, qui se manifeste notamment par une mauvaise rétention de ce minéral (Cappuccio *et al.*, 2000). Des chercheurs pensent que le calcium de source alimentaire pourrait contribuer à maintenir une tension artérielle normale et ainsi protéger le système cardiovasculaire.

Certaines études ont prouvé qu'un supplément de calcium pourrait abaisser le niveau de cholestérol sanguin : c'est ce qu'indiquent les résultats d'un essai clinique mené par des chercheurs québécois auprès de 63 femmes souffrant d'obésité ou d'embonpoint (Major *et al.*, 2007). De la même façon, Davies *et al.* (2000) ont également prouvé que la consommation de calcium pouvait empêcher la prise de poids. Mais le mécanisme reste encore inexpliqué.

Enfin, sous forme de bromure ou de bromogalactogluconate de calcium, le calcium a des vertus sédatives. Il est utilisé dans le traitement d'appoint des troubles légers du sommeil, de l'irritabilité et de la nervosité.

I.1.5.2. En cosmétique

Le marché de la cosmétologie est un marché impressionnant : 15 milliards d'euros en France en 2007. Un chiffre impressionnant d'autant plus qu'il est en progression pour la 40^{ème} année consécutive². En 2008, bien qu'en ralentissement, le marché mondial a connu une croissance satisfaisante de plus de 5%. En revanche, l'année 2009 a été particulièrement difficile pour le secteur de la beauté, même si la croissance mondiale est restée positive.

L'industrie des cosmétiques comprend « tout produit destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain, en vue de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles » (Code de la Santé publique, article L.5131-1). Que représente le calcium dans ce marché ?

Il est utilisé dans les cosmétiques, comme un agent polyvalent aussi bien pour son pouvoir abrasif (*e.g.* sous forme de carbonate dans le dentifrice ; sauf dans les gels où il est remplacé par de la silice) que pour ses propriétés épaississantes et opacifiantes ou comme charge pour donner de l'adhérence au produit (*e.g.* fond de teint). Le calcium est paradoxalement très peu exploité pour ses propriétés actives en dermocosmétologie alors que son rôle est essentiel dans les différentes couches de la peau. La raison tient à ce que l'on connaît très mal la régulation de ses effets.

De plus, il correspond à la nouvelle tendance du marché : le retour au « bio ». En 2008, le marché français de la cosmétique biologique a réalisé un chiffre d'affaires de 250 millions d'euros, en hausse d'environ 20% par rapport à l'année précédente ; le produit bio ne représentant cependant que 2 à 3% du marché cosmétique en France, selon la Fédération des Entreprises de la Beauté (FEBEA)³.

² <http://www.marketing-etudiant.fr/exposes/c/marche-cosmetiques.php>

³ <http://www.bioalaune.com/fr/actualite-bio/278/cosmetiques-bio-des-normes-plus-exigeantes-des-2010>

I.2. Le calcium dans la nature : l'exemple du banc à rudistes d'Orgon

En géologie de surface, le calcium est principalement associé au CO₂ sous la forme solide de carbonate : CaCO₃. On parle du cycle du calcium qui est étroitement lié au cycle du carbone. C'est en effet en grande partie grâce à la séquestration du CO₂ sous forme de carbonate de calcium que l'atmosphère primitive de la Terre s'est transformée. La plupart des carbonates de calcium sont d'origine biologique : ce sont des biocalcaires. Le biocalcaire étudié dans cette thèse s'est déposé à la fin du Crétacé inférieur (il y a 120 millions d'années), à Orgon (Bouches du Rhône). Afin de mieux comprendre le choix et l'intérêt de cet échantillon, nous allons retracer son histoire.

I.2.1. Contexte géologique: Paléogéographie du Crétacé dans le bassin du Sud-Est de la France

I.2.1.1. Paléogéographie

Au Jurassique final-Crétacé inférieur, les Alpes n'ont pas encore émergé. La mer Téthys s'étend vers l'Est de l'Europe actuelle et le Sud-Est de la France forme un golfe qui s'étend du Jura à la Provence (Figure 3). Cette région est marquée par l'évolution d'un bassin intracratonique. En effet, une réorganisation paléogéographique eut lieu créant un bassin de direction générale E-W qui s'est creusé par subsidence, très importante, supérieure au remplissage sédimentaire, de sorte que ce bassin s'approfondit et donna naissance au bassin Vocontien. Cette subsidence est née du jeu de failles de direction N-S induisant des demi-fossés de blocs basculés (hémigraben). Cet événement est considéré comme étant un écho du rifting survenant à ce moment dans le Domaine Pyrénéen alors que l'Atlantique Nord et le Golfe de Gascogne étaient en ouverture.



Figure 3. Configuration paléogéographique du sud-est de la France au Barrémien supérieur. On distingue la fosse en gris, la ceinture bioclastique (rayé) et la plateforme carbonatée en blanc. (Masse and Fenerci, 2006)

La complexité géologique de ce bassin est due en grande partie à la présence d'un réseau dense de failles :

- le système de failles des Cévennes
- la faille de Nîmes (Orgon se situe sur la faille de Nîmes, proche des intersections entre cette faille et son prolongement (Figure 4)).
- le prolongement vers le Nord de la faille de Nîmes de direction N-S
- et la faille d'Aix ou Faille de la Durance

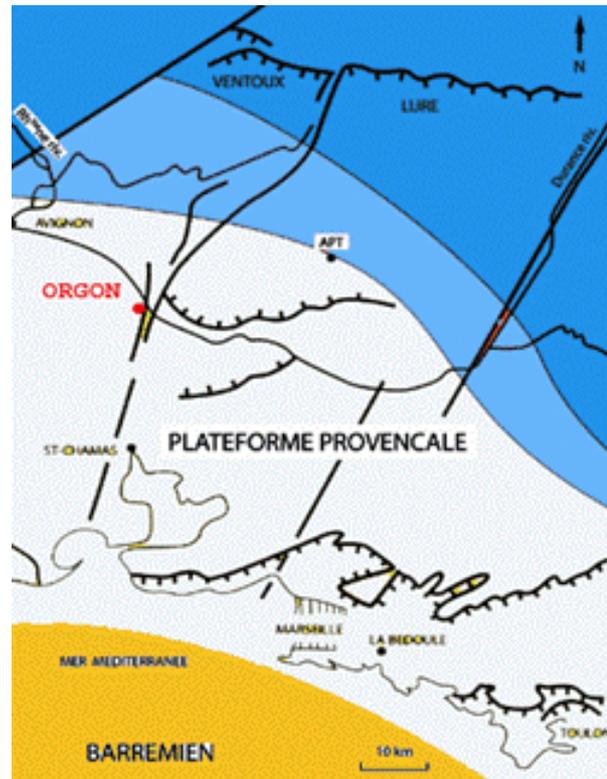


Figure 4. Carte représentative de la paléogéographie du bassin sud-est de la France au Barrémien supérieur (Masse, 1993)

La partie Sud du bassin vocontien constitue une plate-forme carbonatée. Les formations qui affleurent à Orgon ont permis de définir le stratotype de l'Urgonien (D'Orbigny, 1850) à partir du calcaire à rudistes datant essentiellement du Barrémien-Aptien inférieur. Orgon était alors situé sur la plate-forme interne du bassin Vocontien (Figure 4).

Qu'est-ce qu'une plate-forme carbonatée de l'Urgonien ?

Les formations carbonatées dites « Urgoniennes » dans lesquelles les rudistes ont joué un rôle important, bien que n'étant pas constructeurs, représentent la sédimentation carbonatée d'une époque définie, le Crétacé inférieur. La biosédimentation urgonienne peut être expliquée par la conjonction de facteurs biologiques (la présence de coraux et essentiellement de rudistes), climatiques (climat chaud et humide) et dynamiques (la croissance et le déplacement de marges continentales) (Rat and Pascal, 1979 ; Rat and Pascal, 1982).

La sédimentation de type boueuse y était prépondérante. L'abondance de ces boues calcaires, qui ont donné des calcaires micritiques, est à l'origine de la compacité des calcaires urgoniens (Rat et Pascal, 1979).

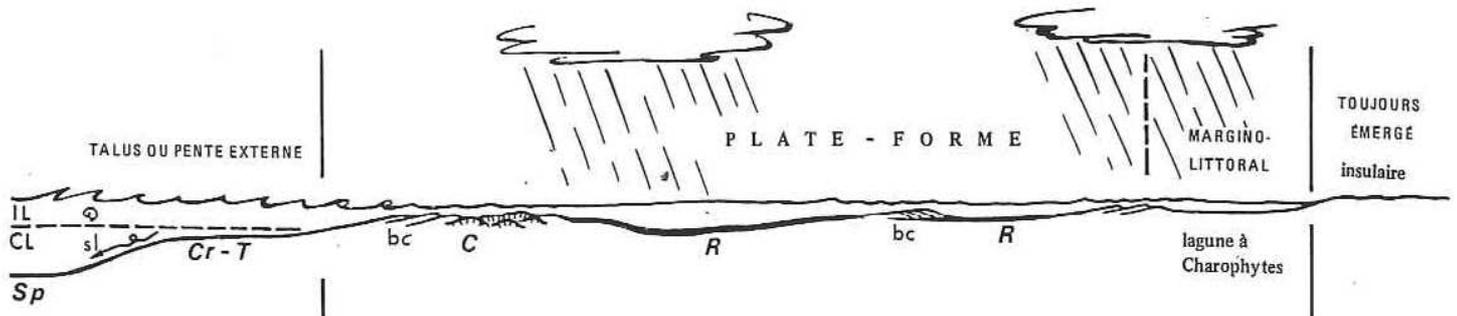


Figure 5. Organisations des plates-formes urgoniennes provençales : plate-forme avec une barrière externe et adossée à un domaine insulaire émergé. C : coraux, Cr : crinoïdes et bryozoaires, T : turrnelles, R : rudistes, Sp : spongiaires, bc : accumulations bioclastiques, IL : infralittoral, CL : circalittoral (Rat et Pascal, 1979).

L'organisation des plates-formes urgoniennes provençales a été décrite: la plate-forme est caractérisée par la présence de rudistes sur substrat sablo-vaseux avec péloïdes et miliolidés. Ce sont des conditions de milieu calme à peuplement benthique dense (Rat and Pascal, 1982). Au-dessus de ces fonds à rudistes pouvaient s'élever différentes formes en relief. Masse (1976) a décrit la présence de constructions coralliennes en Provence servant de barrière entre la plate-forme, plus ou moins protégée et le domaine externe, ouvert, de bassin (Rat and Pascal, 1979). Enfin, on retrouve à l'extrémité opposée, l'ensemble margino-littoral provençal, où on y distinguait plages et marais maritimes avec lagunes plus ou moins dessalées (signe d'un isolement relatif par rapport à la mer): ceci permet d'affirmer des apports terrigènes nuls (Masse, 1976 ; Rat and Pascal, 1982).

Qu'est-ce qu'un calcaire de plateforme ?

« C'est un calcaire formé par des boues, des fragments ou des parties entières de squelettes ou de coquilles carbonatées. Ces organismes vivaient sur une plate-forme marine peu profonde. Leurs fragments appelés bioclastes, ont été transportés et redéposés pour donner un sable ou une vase calcaire à l'origine du calcaire de plate-forme. Aussi, on peut considérer qu'une

plate-forme carbonatée est un organisme vivant car les sédiments qui la constitue sont essentiellement d'origine biologique et se sont déposés sur place ou non loin delà où ils ont été produits. En ce sens, les sédiments carbonatés diffèrent des sédiments détritiques qui eux sont amenés par l'eau ou par le vent de l'aire d'érosion à l'aire de dépôt. » (Arnaud-Vanneau, 2007).

Au Valanginien inférieur, Orgon se situe au niveau pélagique mais la plateforme carbonatée progresse alors vers le nord (Figure 6). Au même moment, des événements de submersion se produisent au nord-est de la Provence avec un épisode, tout particulièrement marquant, au milieu du Valanginien. A l'Hauterivien moyen-inférieur, la propagation de la plateforme est interrompue par une phase de submersion. Ensuite, à l'Hauterivien supérieur-Barrémien, une nouvelle phase de propagation de la plateforme se produit et au Barrémien supérieur, la plateforme provençale atteint la région du Ventoux, i.e. sa plus grande étendue : elle est distante de la côte méditerranéenne de 100km. Orgon se situe alors sur la plateforme interne et les dépôts précédents sont alors recouverts par les faciès à rudistes. Cette phase se termine par un nouvel épisode de submersion où les couches de calcaires à rudistes sont recouvertes de sédiments riches en carbone organique. La transgression du Crétacé est d'une rare ampleur; la montée du niveau de la mer est telle qu'une assez grande partie du domaine continental est envahie par des mers épicontinentales. On estime que le niveau des mers devait être 200 à 300 mètres plus élevé qu'actuellement (Masse and Philip, 1981 ; Masse, 1993). A l'Aptien inférieur, un bassin sud-provençale se creuse et crée deux plateformes carbonatées, l'une sud-provençale et la seconde nord-provençale. Puis une régression généralisée des eaux s'est produite suivie du soulèvement de la croûte à la fin du Crétacé (Masse, 1993). En effet, à l'Albien le nord de la Provence va émerger, c'est le bombement durancien, et ainsi bloquer la communication entre la mer Alpine et le golfe de Basse-Provence (Philip, 1970; Masse and Philip, 1976). Le bombement durancien correspond à plusieurs zones émergées, soulevées par l'influence de l'orogénèse pyrénéenne.

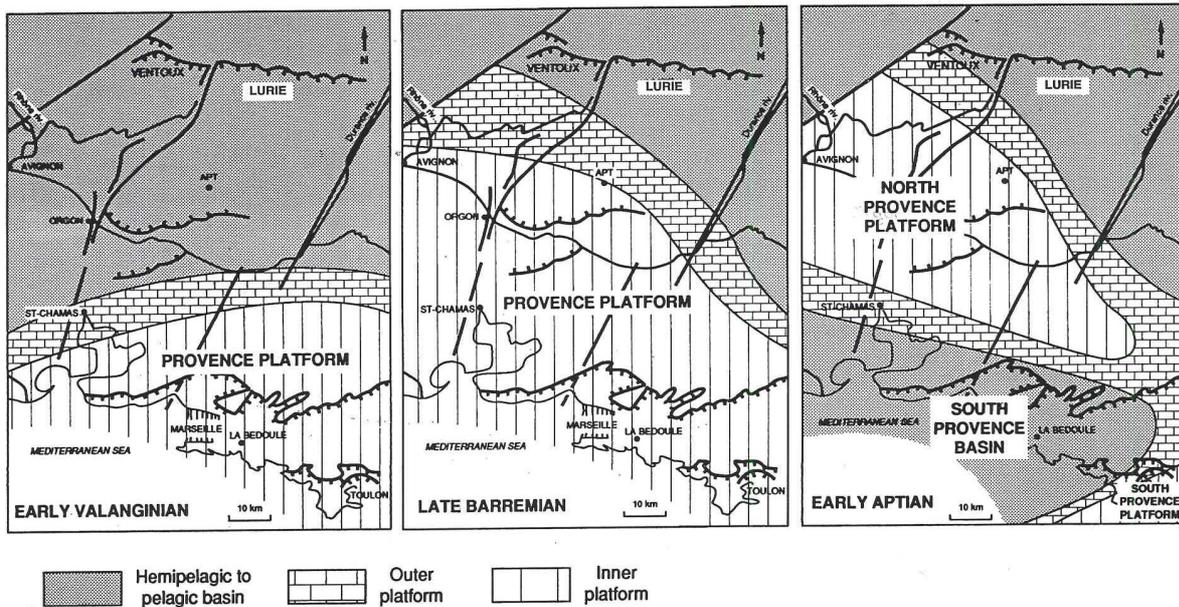


Figure 6. Cartes paléogéographiques correspondant aux phases principales de l'évolution de la plateforme carbonatée (Masse, 1993).

I.2.1.2. Colonne stratigraphique

Au Valanginien et à l'Hauterivien, on retrouve à Orgon des marnes et calcaires marneux (Figure 7). Les calcaires Urgonien sont limités au Barrémien avec des packstones-grainstones datant du Barrémien inférieur-moyen et des facies à coraux et rudistes d'âge Barrémien supérieur. On peut observer la succession des couches géologiques suivantes (Masse, 1993) :

- Une couche inférieure bioclastique (50m d'épaisseur) contenant des bryozoa, des éponges et des bivalves
- Des calcaires caillouteux à grains fins (160m d'épaisseur) avec des Toxasters
- Une couche bioclastique (200m d'épaisseur) avec un assemblage micropaléontologique du Barrémien inférieur et un calcaire oobioclastique du Barrémien moyen-supérieur au-dessus.
- Enfin, on retrouve une couche de coraux surplombée d'une couche de rudistes (100m d'épaisseur) datant du Barrémien supérieur (Aptien inférieur), i.e. le facies Urgonien proprement dit et défini par d'Orbigny. Cette couche est la couche essentiellement analysée dans ce mémoire.

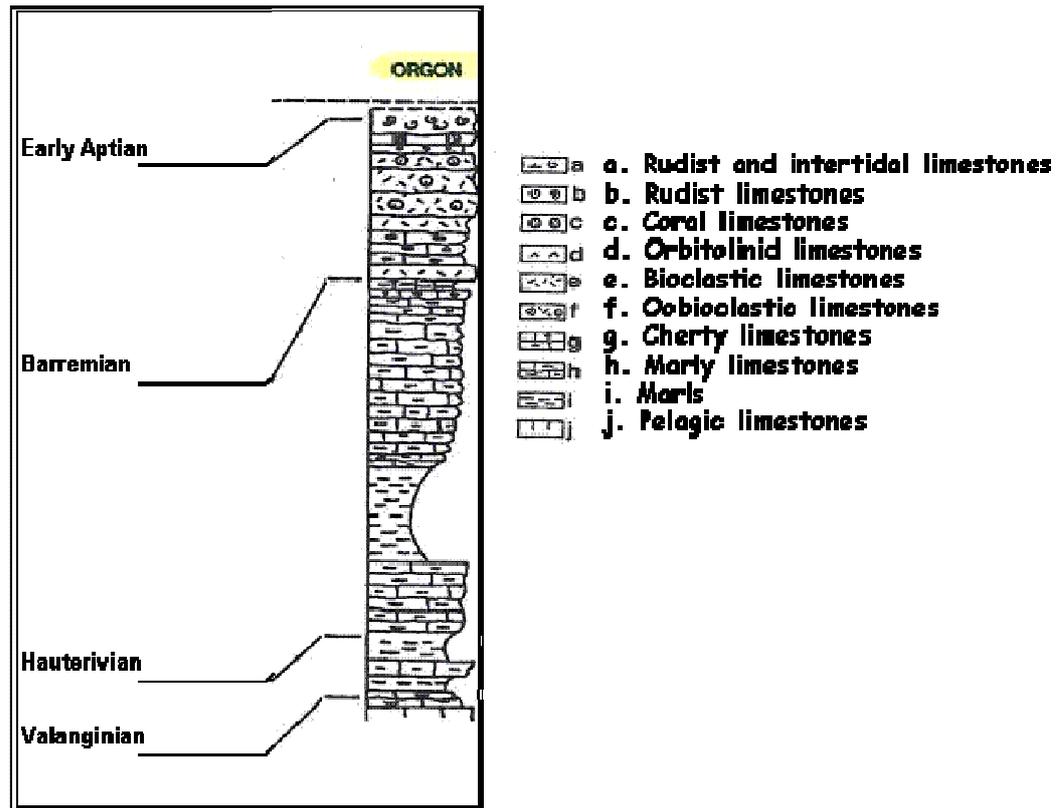


Figure 7. Stratigraphie à Orgon (Masse, 1993).

I.2.2. Qu'est ce qu'un rudiste ?

Au Barrémien-Aptien, période où les rudistes étaient les principaux composants des plateformes carbonatées des bords de la Téthys (Masse and Fenerci-Masse, 2006), Orgon se situait dans la zone subtidale, c'est-à-dire la zone située en-dessous de la zone de balancement des marées, une zone peu profonde (Masse, 1993). C'était un niveau de faible à moyenne énergie signifiant un faible apport terrigène (Masse and Philip, 1981). Le climat était alors chaud. Ces conditions représentaient les facteurs idéaux pour le développement et la croissance des rudistes (Masse and Philip, 1981). De plus, le socle devait être stable pour la création de la plateforme et la variation du niveau de la mer faible. Enfin, ils nécessitaient l'absence d'organismes restreignant les conditions océanographiques (Masse and Philip, 1981).

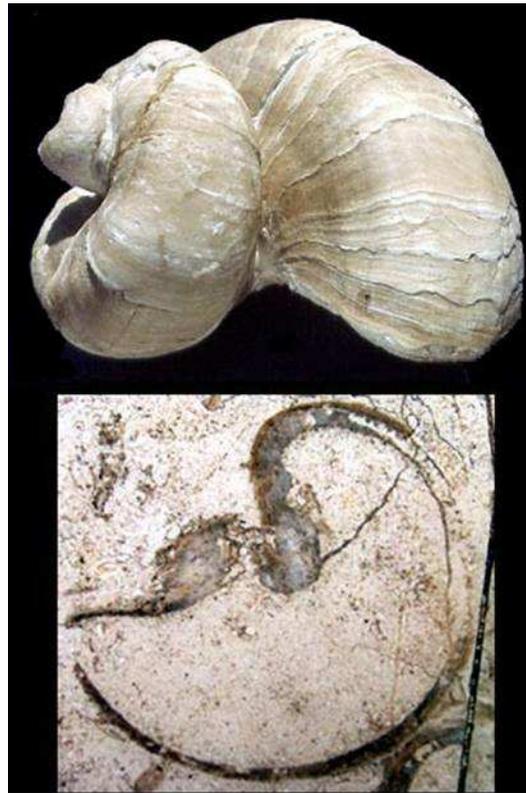


Figure 8. *Requienia Ammonia* d'Orgon. Barrémien supérieur (en bas, une coupe caractéristique du bivalve montrant son épaisse coquille)

Les rudistes (figure 8) ont vécu entre la fin du Jurassique et la fin du Crétacé et ont dominé toutes les autres formes récifales jusqu'à leur extinction de masse Crétacé-Tertiaire où ils ont complètement disparu. Les rudistes ont à cette période remplacé les coraux et étaient parmi les plus importants producteurs de carbonates (Gili *et al.*, 1995). Cependant, ils doivent être considérés en tant que producteurs de sédiments et non de récifs au sens strict du terme; en effet leur contribution squelettale était faible (12.8-13.2%) et ils ne présentaient aucun relief topographique contrairement aux coraux (Gili *et al.*, 1995 ; Masse and Fenerci-Masse, 2006). A la fin du Crétacé, les Requieniidae ont souffert d'un déclin important dû à la baisse du rapport Mg^{2+}/Ca^{2+} dans les eaux des mers (Gili *et al.*, 1995 ; Steuber and Rauch, 2005, Hautmann, 2006).

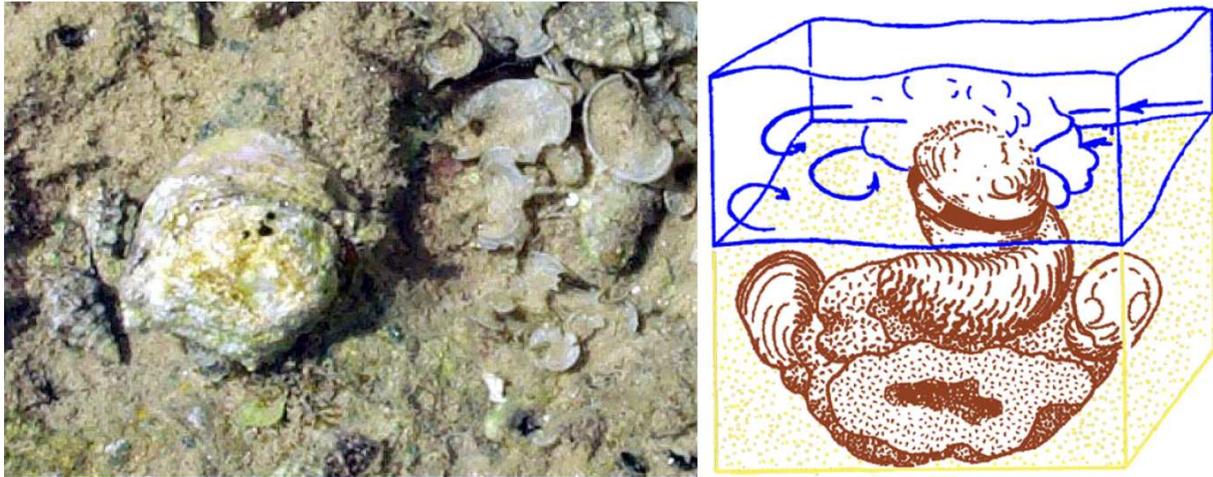


Figure 9. *Chama* vivant dans le Golfe d'Aqaba (Hottinger, 1984). La valve spirale est fixée et l'ouverture reste plus ou moins parallèle au fond marin.

Les rudistes sont l'un des constituants les plus importants des lagons au Crétacé. Ils ont généralement une valve fixée sur le substrat et une valve operculaire moins développée, plate ou en bonnet phrygien, qui ferme la coquille. C'est le cas chez les requieniidae comme on peut le voir chez les *Chama* actuels (Figure 9). Leur coquille est issue de la biominéralisation (Figure 10), *i.e.* la matrice organique s'organise en une structure dans laquelle les cristaux d'aragonite et de calcite viennent minéraliser. Cette minéralisation est elle-même sous le contrôle de la matrice organique (Addadi *et al.*, 2006). Les composants majeurs de cette matrice sont des polysaccharides essentiellement de la chitine (Weiner and Traub, 1984), des protéines (Marin and Luquet, 2004) et des lipides. Les coquilles de rudistes sont composées d'une couche externe calcitique et d'une couche interne aragonitique (Skelton, 1976).

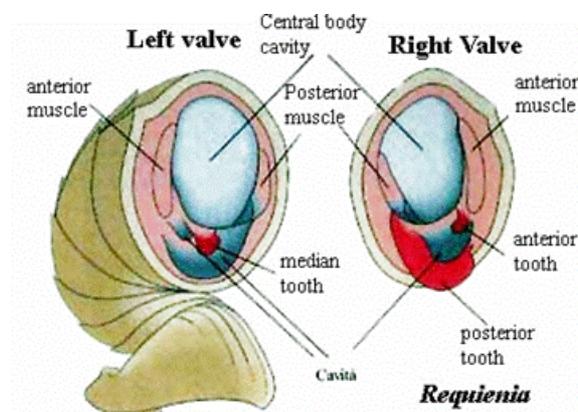


Figure 10. Description des deux valves d'une *Requienia*.

La couche interne a presque toujours été dissoute et a recristallisée en calcite. Par contre, de nombreuses études ont prouvé que la couche externe épaisse et compacte était relativement résistante aux altérations diagénétiques (Al-Aasm and Veizer 1986 ; Steuber, 1999 ; Steuber and Rauch, 2005). En effet, cette coquille a même permis de préserver des couches aragonitiques dans de nombreux fossiles datant du Mésozoïque (Hall and Kennedy, 1967 ; Al Aasm and Veizer, 1986).

I.2.3. Avantages du site d'étude

Mes échantillons ont gracieusement été fournis par la Société Omya⁴ qui exploite actuellement, les calcaires du Barrémien supérieur-Aptien inférieur de la carrière d'Orgon. Ce niveau à texture crayeuse est, comme on l'a vu, riche en rudistes. Mes échantillons proviennent de cette couche (OrgonU) et le prélèvement demandé est un concentré de coquilles de rudistes (OrgonT). C'est un calcaire d'une grande pureté puisqu'il contient plus de 99% de calcite. Il est si pur que 0.5% de la production d'Orgon est envoyé à l'industrie pharmaceutique européenne pour les pansements gastriques, les médicaments neurologiques et la formulation. Le gros de la production (700 000tonnes/ an) est vendu sous forme de poudres :

- charge pour les matériaux à haut indice de blancheur (peinture, coating).
- additifs dans la fabrication des cosmétiques.
- additifs dans les aliments du bétail.

Etant donné la pureté de l'échantillon et la présence de nombreux rudistes qui, d'après la littérature pourraient encore contenir leur matrice organique, cette couche ne pourrait-elle pas être valorisée à des fins pharmaceutiques plus intéressantes ? En effet, comme il va en être discuté dans le chapitre suivant, de nombreuses propriétés biologiques ont été découvertes dans les coquilles de biominéralisation actuelle telle que la nacre...

⁴ Je remercie tout particulièrement MM Serge Bastié, directeur Production et Qualité du site d'Orgon et Sébastien Clauser, géologue en chef d'Omya France pour leur aide.

I.3. Biominéralisation du calcium et Pharmacopée

I.3.1. La Nacre, exemple actuel d'association organo-minérale

La nacre est depuis plusieurs décennies la texture coquillière de biominéralisation la plus étudiée pour son intérêt économique, son utilisation en chirurgie réparatrice osseuse (Atlan *et al.*, 1997) ou encore à cause de ses propriétés mécaniques remarquables (Jackson *et al.*, 1988). Elle est considérée comme modèle de référence et elle est présente au sein de quatre des huit sous-classes de mollusques (Chateigner *et al.*, 2010). Il y a trois types de nacre. Celle qui constitue les bivalves possède une structure tridimensionnelle en brique et mortier aux propriétés particulières. C'est grâce à sa structure répétitive que la nacre possède un comportement si particulier vis de la lumière (Figure 11). Elle est en effet formée d'une juxtaposition régulière de couche de tablettes d'aragonite de 0,5 μm d'épaisseur, soudées par un ciment organique de 30 nm d'épaisseur (Shen *et al.*, 1997).

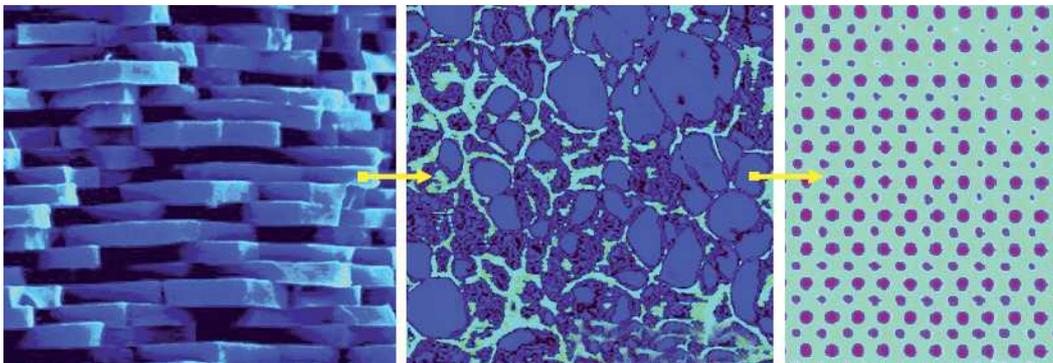


Figure 11. L'observation de la nacre avec des grossissements croissants met en évidence sa structure multiéchelle (Lopez *et al.*, 2008):

- a) au microscope à balayage (MEB) ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$)
- b) au microscope à force atomique (AFM) ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$)
- c) au microscope électronique à transmission (MET) ($0,005 \times 0,005 \mu\text{m}^2$)

Les composés organiques associés à la nacre sont localisés autour des tablettes minérales et forment ainsi la structure dans laquelle s'effectue le dépôt des tablettes polygonales d'aragonite; ce sont essentiellement des polysaccharides (i.e. la chitine) et des protéines hydrophobes (Addadi *et al.*, 2006). La matrice organique soluble se retrouve quant à elle occluse à l'intérieur des cristaux et contrôle l'initiation de la précipitation du minéral, la régulation de la croissance, la détermination du polymorphe cristallin, etc....Même si la

composition et les fonctions de cette matrice organique ne restent encore que partiellement connues, de nombreux travaux ont permis de décrire certaines de ces molécules. Certaines de ces protéines ont d'ailleurs été étudiées et caractérisées (Marin and Luquet, 2004). Cependant, l'ensemble des connaissances acquises l'ont été à partir de l'étude d'un nombre restreint de modèles biologiques appartenant principalement à deux genres de mollusques - *Pinctada* pour les bivalves et *Haliotis* pour les gastéropodes.

Nous allons voir dans ce chapitre que les molécules extraites de la nacre sont reconnues par les cellules constitutives de notre squelette osseux, de notre cartilage mais aussi par celles de notre peau.

I.3.2. La peau et les associations organo-minérales

La peau est un tissu de soutien. Malgré les différences évolutives, il existe une homologie de position entre la coquille de nacre et la peau humaine. De là, l'idée du Pr Lopez d'étudier les effets de la nacre sur la peau (Lopez *et al.*, 2008a). En effet, la nacre fait partie intégrante des pharmacopées anciennes. Elle a été utilisée dans de nombreuses préparations pharmaceutiques afin de protéger la peau. Les chinoises ont par exemple utilisé la nacre polie pour se frotter le visage ; cette pratique devait permettre de stimuler la circulation sanguine et d'équilibrer le potentiel bioélectrique des cellules de l'épiderme. On sait aujourd'hui que cela facilite le transfert des oligo-éléments et des molécules de la nacre au travers de la peau (Lopez *et al.*, 2008a). Morvan (2009) a démontré récemment une stimulation des fibroblastes du derme uniquement grâce à l'apport de calcium. Les premières études sur l'implantation de poudre de nacre dans la peau de rats ont montré qu'elle améliorait la synthèse de la matrice extracellulaire, la production de composants impliqués dans l'adhésion et dans la communication cellulaire ainsi que la synthèse de collagène type I et III (Lopez *et al.*, 2000). Il a également été démontré une activité sur les cellules germinales souches des cellules épidermiques ce qui contribue ainsi à réguler de façon optimale la stratification épidermique, source de bonne santé cutanée. Les lipides étant le principal constituant de la barrière cutanée, Rousseau *et al.* (2006) ont montré qu'il était possible de renforcer la barrière cutanée en traitant la peau à l'aide de compositions cosmétiques régénérantes, contenant un principe actif riche en lipides extraits de la nacre. Il a été démontré que ces lipides stimulent la production

de filaggrine, molécule qui permet à la couche cornée, de rester hydratée dans un environnement peu humide et donc de protéger des agressions extérieures.

Ces travaux ont donc soulevé beaucoup d'intérêt quant à la valorisation possible de réserves importantes de molécules fossiles de calcification à des fins médicales et cosmétiques. Dans ce travail nous montrons que le calcium, s'il est associé aux molécules organiques extraites de calcaire biogénique, peut constituer une source d'actifs pour la régénération épidermique et/ou l'hydratation de la peau.

I.3.3. L'os et les associations organo-minérales

La nacre et l'os sont des structures homologues qui ont évolué indépendamment. En effet, il y a une homologie de fonction entre la nacre qui représente le squelette externe des mollusques et l'os qui représente le squelette interne. Tous deux sont issus du processus de biominéralisation ; ce dernier commence par la synthèse de la matière organique nécessaire et ceci par des cellules spécialisées (les cellules du manteau pour la nacre et les ostéoblastes pour l'os). Celle-ci va alors servir de cadre pour le dépôt du minéral : du carbonate de calcium sous forme d'aragonite pour la nacre et du phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite pour l'os.

I.3.3.1. L'Ostéoformation

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

- **L' Ostéoinduction** est la capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisée (définition de GESTO, Groupe d'Etude des Sciences du Tissu Osseux). Ce phénomène nécessite un stimulus inductif permettant un recrutement de cellules non engagées dans la voie ostéoblastique.
- **L' Ostéogénèse** caractérise la capacité des cellules génétiquement prédifférenciées d'évoluer en pré-ostéoblastes et en ostéoblastes. Ce phénomène se produit pendant la régénération osseuse.

Les cellules mésenchymateuses ont une certaine plasticité et peuvent se différencier en chondroblastes, ostéoblastes ou adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription, dont certains ont été identifiés : c'est la phase d'ostéoinduction. Se produit alors l'ostéogénèse où les grandes étapes sont caractérisées par la prolifération et la différenciation de ces cellules souches engagées dans la voie ostéoblastique. Elles se différencient alors en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Le développement de modèles cellulaires et génétiques a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le recrutement, la différenciation, la fonction et l'apoptose de l'ostéoblaste. La différenciation des ostéoblastes nécessite l'expression coordonnée de plusieurs facteurs de transcription systémiques et locaux qui contrôlent l'expression des gènes cibles au cours de l'ossification. Plusieurs marqueurs sont aussi exprimés de façon séquentielle au cours de la différenciation ostéoblastique. Ces molécules sont indiquées sur la figure 12 et ne seront pas détaillées dans cette thèse.

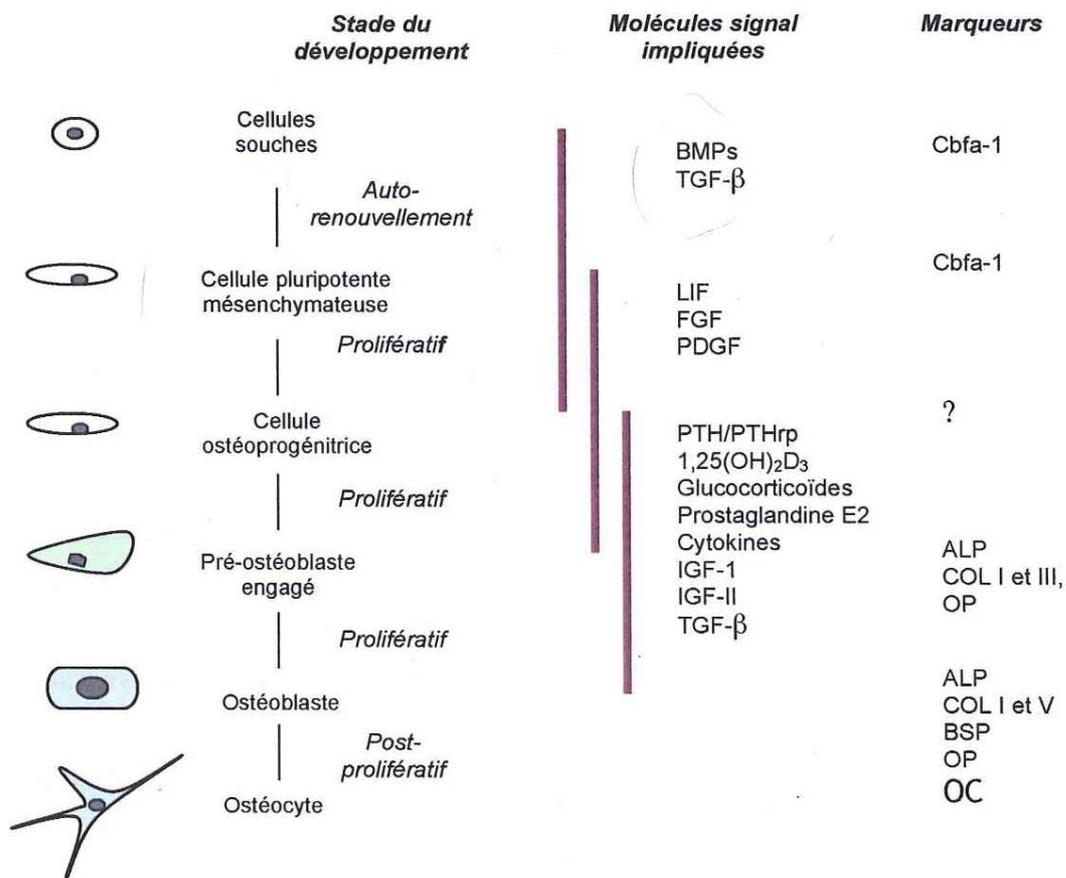


Figure 12. Régulation du développement et de la différenciation de l'ostéoblaste (Lian et al, 1999)

Puis a lieu la phase de maturation qui est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques et associés à la production de matrice tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéopontine et la fibronectine. Les ostéoblastes différenciés expriment enfin des marqueurs tardifs de la différenciation tels que l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse.

I.3.3.2. Les Potentialités ostéogènes de la Nacre

En 1972, Amadeo Bobbio examina des crânes vieux de plus de 500 ans mis au jour au Honduras. Il découvrit que les Mayas remplaçaient les dents disparues par des fragments de nacre. Les radiographies montrent que la nacre est parfaitement ostéointégrée. Os et nacre semblent donc partager, au-delà de leur distance évolutive, certains mécanismes de contrôle

de la biominéralisation. Afin de vérifier cette hypothèse, l'équipe du Pr Lopez (1992) a mené des expériences *in vitro* qui consistaient à mettre un fragment de nacre en contact avec des ostéoblastes en culture (figure 13). Les observations faites montrent que la nacre est reconnue par les cellules osseuses : elle stimule la prolifération des ostéoblastes à son contact et induit la production d'une nouvelle matrice organique sans développer de toxicité cellulaire.



Figure 13. Réaction autour d'un fragment de nacre posé dans une culture cellulaire d'ostéoblastes humain. Caractère Ostéogénique de la nacre.

En site crânien, le phénomène d'ostéoinduction provoqué par la nacre a été démontré *in vivo* : il se déroule complètement jusqu'à l'obtention d'os mature (Le Faou, 1996). Ces résultats ont également été confirmés avec un os maxillaire : en effet, des études *in vivo* ont été conduites et l'équipe du Pr Lopez (Atlan *et al.*, 1997) ont placé de la poudre de nacre provenant de *Pinctada maxima* dans des os de patients porteurs de déficits osseux. Ils ont constaté que les implants étaient parfaitement tolérés : la nacre a subi une biodissolution et a été remplacée par un os néoformé. Deux ans plus tard, un fragment de nacre a été placé au sein d'un fémur : une activité cellulaire, moléculaire et ionique a été démontrée à l'interface os/nacre (Atlan *et al.*, 1999). La nacre manifeste donc les trois propriétés qui la rapprochent de l'os, *i.e.* ostéoconduction, propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, ostéoinduction et ostéogénèse. Ces chercheurs ont suggéré l'existence de molécules signal contenues dans la nacre qui stimuleraient la régénération osseuse. Ces molécules organiques ont ainsi été extraites et ont démontré une stimulation de la phosphatase alcaline, marqueur de la différenciation des ostéoblastes (Lamghari *et al.*, 1999). De nombreuses études ont donc été conduites sur les relations entre cette fraction soluble extraite à l'eau et la formation de l'os ; il a été prouvé que l'extrait stimulait la production de phosphatase alcaline ainsi qu'une baisse

simultanée de la production de protéines : c'est la phase d'ostéoinduction, i.e. la différenciation cellulaire (Almeida *et al.*, 2000 ; Pereira-Mouries, 2003). Cette fraction soluble a été démontrée également compétente pour stimuler toutes les cellules de la lignée osseuse et même accélérer le processus de différenciation et de minéralisation de l'os (Rousseau *et al.*, 2003 ; Pereira-Mouries, 2003).

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

CHAPITRE II : Stratégie de l'Etude

Cette thèse a été menée pour faire la démonstration qu'il existe dans le monde géologique des accumulations de molécules liées à la biominéralisation du carbonate de calcium dans un bon état de conservation. Ensuite il s'agit pour moi de prouver que ces molécules ont conservé une activité biologique. Ceci sera réalisé à la fois sur les cellules de la peau et de l'os. Si tel est le cas, il s'agit enfin de chiffrer quels gisements potentiels elles représentent pour l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou cosmétique.

Pour faire cette démonstration, nous commencerons dans le chapitre III par démontrer la préservation des molécules organiques de biominéralisation au sein du gisement d'Orgon. Les preuves de la bonne conservation de la matrice organique dans la couche externe sparitique des rudistes seront attestées par plusieurs techniques telles que la microscopie photonique, la microscopie électronique à transmission et à balayage,... La séquence diagénétique sera étudiée grâce à l'analyse par cathodoluminescence et à la microscopie photonique des coquilles de rudistes *Requienia ammonia*. Il s'agit de montrer que la recristallisation des coquilles permet la conservation des molécules organiques d'intérêt et qu'il n'y a aucune contamination par des biomasses détritiques.

Dans une seconde partie, chapitre IV, après avoir démontré la préservation de la matière organique, nous montrerons qu'il est possible d'extraire des protéines et des lipides associés au calcium des calcaires. A Orgon (SE France) cela représente un gisement potentiel d'environ 100 tonnes de protéines et 1450 tonnes de lipides extractibles pour l'industrie pharmaceutique. Ces molécules constituent bien la matrice organique résiduelle de calcification à l'origine de l'élaboration des coquilles de rudistes. Cette matrice sera extraite du calcaire selon divers protocoles : une extraction à l'eau, une extraction par décarbonatation et une extraction à l'éthanol pour concentrer les lipides. La caractérisation sera réalisée par différentes techniques classiques de géochimie organique et de biochimie.

Dans le chapitre V, l'étude sur l'activité résiduelle des molécules fossiles est menée sur des explants de peau humaine maintenue en survie. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire Bio-EC du Dr Elian Lati à Longjumeau. Ce sont des tests « *ex-vivo* » évaluant les activités des deux extraits d'Orgon: d'une part, l'extrait à l'éthanol nommé OrgonE. Il est essentiellement constitué de lipides et de chlorure de calcium formés lors de l'extraction après ajout d'acide chlorhydrique. Il contient également des protéines. Le deuxième extrait,

OrgonW, a été obtenu par simple agitation dans un solvant essentiellement constitué d'eau pure. L'activité de cet extrait a été comparée au même extrait acidifié et donc décarbonaté, ce qui a permis de concentrer les molécules organiques. Afin de mettre en évidence l'activité des molécules extraites de la carrière d'Orgon, nous avons comparé cette activité à celles du carbonate de calcium chimique (contrôle négatif) et à de la nacre provenant de coquille de l'huître *Pinctada margaritifera* (contrôle positif). Ces deux témoins étant extraits avec le même protocole que celui de l'extrait testé. Le chapitre V se présente sous la forme de deux projets de publication.

Enfin, le chapitre VI a été consacré à l'évaluation de l'activité résiduelle des molécules fossiles extraites sur l'os. Tout comme l'équipe du Pr Lopez l'a démontré, notre objectif est de montrer la stimulation des phénomènes d'ostéoinduction et d'ostéogénèse par les extraits d'Orgon. Pour vérifier cette hypothèse, nous devons réaliser des expériences *in vitro* sur des cellules représentatives de différents stades d'évolution de la lignée ostéoblastique en présence de l'extrait. Les témoins positif (Nacre de *Pinctada Margaritifera*) et négatif (carbonate de calcium chimique) ont également été testés.

Enfin nous arriverons en fin de mémoire à une conclusion générale qui établira les résultats de cette thèse : les molécules fossiles de biominéralisation s'accumulent dans les calcaires de plateforme. Ces molécules peuvent être extraites. Cette étude démontre pour la première fois que malgré la diagenèse, elles sont reconnues par les cellules humaines. Elles conservent un effet stimulant sur certaines fonctions de la peau ou de l'os à l'instar des molécules de la nacre actuelle. Certaines stimulations sont même originales ce qui ouvre des perspectives nouvelles sur le rôle de « maturation » que produit la diagenèse.

CHAPITRE III :
Diagénèse et Préservation du contenu
organique dans les plateformes carbonatées

III.1. Résumé de la publication 1

Orgon est une carrière de biocalcaires dont la quasi-totalité des dépôts sont des grainstones à grain fin, peloïdaux et à miliolodae, renfermant quelques débris clastiques et des fossiles. Cette roche est d'une grande pureté avec plus de 99 % de calcite non magnésienne. Ceci a été confirmé dans cet article par diffraction des rayons-X, spectrométrie infrarouge et cathodoluminescence. L'analyse des éléments traces, réalisée par ICP-AES⁵ a montré plus de 50% de calcium, un peu d'aluminium et de silicium ainsi que des traces de fer, de magnésium, de sodium et de potassium (Tableau 1). En analysant le résidu insoluble à l'acide aux rayons-X⁶ et par infrarouges, on observe la présence d'environ 0.05% de kaolinite qui concentre le silicium et l'aluminium. La kaolinite est considérée comme un apport détritique d'après Chamley et Masse (1975). Des traces de quartz ainsi que des plagioclases et des feldspaths potassiques ont également été mis en évidence. La contribution détritique est donc négligeable.

Lors de l'étude des événements diagenétiques subis par les rudistes, la couche interne a été dissoute tandis que la couche externe calcitique n'a subi qu'une recristallisation en calcite non magnésienne (Al-Aasm and Veizer, 1986 ; Steuber and Rauch, 2005). Dans cet article, la séquence diagenétique a été retranscrite grâce aux rudistes *Requienia ammonia* (Orgon). Les coquilles ont tout d'abord été observées en microscopie photonique⁷ (Figure 14 et 16) puis par cathodoluminescence (Figure 15, 17 et 18). La couche aragonitique a d'abord été totalement dissoute puis la couche externe a recristallisé en calcite non magnésienne sous forme de grands cristaux palissadiques (dLMC, avec un spectre vert sombre de cathodoluminescence, figure 15). Cette recristallisation s'est effectuée de façon centripète. Ceci est visible à la figure 16 qui montre des figures de croissance en « chapeau chinois ». Il s'agit d'un processus de précipitation/recristallisation avec une faible diffusion des éléments. L'étape suivante montre un remplissage par un sable coquiller, l'attaque de la couche recristallisée (dLMC) par la faune endolithique puis une cimentation primaire micritique (orangée en cathodoluminescence). Enfin, une sédimentation interne s'est produite et a conduit au

⁵ Je remercie Patrick Baillif et Rachel Boscardin pour la qualité de leurs analyses.

⁶ Merci à Philippe Penhoud pour les analyses aux Rayons X.

⁷ Merci à Sylvain Janiec pour la qualité des lames.

remplissage des dernières porosités par une sparite très pure (vert sombre en cathodoluminescence).

L'objet de cette publication consiste à montrer que la matrice organique de biominéralisation associée à la formation des coquilles de rudiste se conserve en inclusion dans la couche externe malgré sa recristallisation. Les analyses Rock-Eval estiment entre 500 et 750g/tonne de matrice organique encore présente dans la roche brute suivant les niveaux. Les preuves de la bonne conservation de la matrice organique sont multiples. En effet, les traces organiques se présentent sous deux formes: d'une part, des alignements organiques qui fluorescent en lumière UV⁸ (figure 20 et 22); la microscopie électronique en transmission confirme qu'il s'agit de films lamellaires organiques (Figure 21) attribués à de la matière organique insoluble. Ces alignements parallèles à la surface ont été préalablement décrits par les auteurs comme des stries de croissance. D'autre part, la fluorescence montre également des globules organiques en inclusions dans ces mêmes cristaux (figure 22). Il s'agit de la matrice organique soluble, dissoute et remobilisée sous forme d'inclusions au cours de la recristallisation (dLMC). Avec ces molécules se retrouvent aussi occlus les éléments traces (magnésium, fer et sodium) (Figure 19).

La séquence diagénétique retranscrite démontre des conditions de diagenèse douces. Cela a permis aux rudistes du massif d'Orgon de préserver les molécules organiques à l'intérieur de leurs cristaux. La diagenèse et la quasi-absence d'apports détritiques à Orgon, permettent d'envisager une très grande qualité de stockage et de pureté du contenu organique de biominéralisation en vue de sa valorisation dans le domaine pharmaceutique (chapitres V et VI).

⁸ Je remercie Mohammed Boussafir pour son initiation et ses conseils pour l'analyse en épifluorescence.

III.2. Publication 1: Cretaceous rudist bivalves: diagenesis and conservation of the organic content

Aurore Dissaux¹, Xavier Bourrat¹, Evelyne Lopez², Vincent Barbin³, Luc Barbanson¹, Jean-Michel Bény¹, Jean-Pierre Masse⁴

¹ ISTO, Université d'Orléans/CNRS/Université François Rabelais-Tours (UMR 6113), Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 45072 Orléans cedex, France.

² Muséum national d'Histoire Naturelle, BOREA (CNRS/MNHN UMR 7208), 43 rue Cuvier, 75231 cedex 05 Paris, France.

³ U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles, 23 rue Clément Ader, 51100 Reims, France.

⁴ Université de Provence Aix-Marseille 1, Centre de Sédimentologie-Paléontologie, case 67, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 03

Keywords : Biomineralization, organic geochemistry, total organic carbon, fluorescence, transmission electron microscopy, cathodoluminescence, IRTF, SEM, TEM.

ABSTRACT

Biogenic limestones of platform settings have an excellent potential to produce and store fossil calcifying organic molecules. These molecules represent a potential source of active substances for the pharmaceutical industry. We show with the example of the cretaceous chalky limestone from Orgon (Provence) that there are real fields, promised to the exploitation in the future. This paper quantifies and analyzes the origin of the organic stock related to the biomineralization of rudists, i.e., fossil bivalves which acted as carbonate producers in the cretaceous platform environments. Petrography shows that the organic matter is preserved in inclusions in the outer layer calcitic part of the fossils into two forms. The first one constitutes the 'growth lines' described by the authors, but hitherto partly explained. Transmission electron microscopy bears out their organic nature corresponding to polysaccharide compartments of the prismatic shell layer. The remaining stock fluoresces as organic globules inside the calcite crystals or at grain boundaries inbetween calcite crystals. The soluble organic matter was dissolved in droplets and trapped during the recrystallization of the neomorphic calcite as primary inclusions in the crystals. Finally, the diagenesis scenario shows that the deposition conditions are oxidizing. This guarantees the absence of contamination by any detrital biomass. The process of sedimentation constitutes a selective storage of molecules with high potential for the industry.

INTRODUCTION

The role of the organic molecules is fundamental in the growth of biocrystals (Mann, 2001; Rousseau *et al.* 2009). These molecules are part of the biocrystal which was described as a hybrid composite with a multiscale structure on the example of nacre (Rousseau *et al.*, 2005). Very little sedimentology works have paid attention to the preservation or change of the organic content during biocarbonate diagenesis. But what happens to them during diagenesis?

Scleractinian are the major carbonate producers in carbonate reefs especially in modern settlement. During the Cretaceous rudist bivalves tend to play the major physiognomic role. Bivalves produce massive structures where the absence of porosity increases the potential for the conservation of the organic matrix. (In this paper, 'matrix' means the organic phase of the biocrystal, following the accepted Biomineralization sense.) At the end of the lower Cretaceous, the Urgonian platform (A. d'Orbigny, 1850) developed in Provence (South East of France) around the Tethys Sea (Masse and Philip, 1981; Rat and Pascal, 1979; Rat and Pascal, 1982). Carbonate production is dominated by rudist bivalves living in the inner zone of the platform (Masse and Fenerci-Masse, 2006). They should be considered as sediment producers and not reef-builders as they have a relatively modest skeletal contribution, and they showed little, if any, original relief contrary to corals (Masse, 1995). The development of these formations were governed by important factors such as shallow water conditions, relative tectonic and eustatic stability, low terrigenous content and a warm climate of tropical to subtropical nature (Masse and Philip, 1981).

We can wonder if the rudists were impacted by a rapid diagenetic decay of organic matrices as corals does (Cuif *et al.*, 1997; Gautret, 2000; Perrin and Smith, 2007; Perrin C, 2004; Repellin and Trichet, 1975). Indeed, mineralized tissues of cephalopods or even better lamellibranchs, more compact, have a better potential of preservation (Dauphin, 2001). A synapomorphy of rudists is the possession of an outer calcite and inner aragonite layers (Skelton 1976). The inner aragonitic shell layers have been almost generally converted to low-Mg calcite (LMC). But the thick and compact outer shell layer of fibrous prismatic calcite has been proved relatively resistant against diagenetic alterations (Al-Aasm and Veizer 1986; Steuber, 1999; Steuber and Rauch, 2005). Compared to foraminifers, brachiopods and

belemnites, being the most widely used archives of geochemical proxies (Veizer *et al.*, 1999), the large size of rudist shells offers the opportunity to study intra-shell variations of the isotopic and chemical composition in detail (Steuber, 1999). Steuber and Rauch (2005) have shown that the outer calcitic layer of requieniidae from Orgon have provided excellent archives for mineral geochemistry (trace elements and isotopic proxies). But what about the organic content?

There is no relationship between the age and the preservation state of original minerals as this latter depends first on the early diagenesis and the attack from bacteria and lithophagous organisms. Besides, Sandberg and Hudson (1983) showed the presence of remnants of the original aragonitic structure in bivalve shells. This and the high level of Sr proved that recrystallization occurred rapidly in one step. Aragonite bearing shells were proven to be preserved if sealed off from pore-water penetration (Stolarski *et al.*, 2009). Indeed, dissolution is one of the most important mechanisms of diagenesis. Biocrystals dissolution was studied by Cubillasa *et al.* (2005): BET surface area-normalized dissolution rates were compared for different polymorphs. These authors found that the kinetics is slowed by the presence of the organic matrix.

Here we show that the organic content of the prismatic layer is partially preserved in the case of rudist bivalves of Orgon. The impact of diagenesis on the conservation of this matrix in the fossils is studied by petrographic and organic geochemistry techniques: cathodoluminescence observations, minor and trace element analyses, SEM and TEM observations complemented by the quantification of the organic carbon content.

MATERIALS AND METHODS

Material

The study is conducted on the chalky limestone of Orgon dating back to the end of lower Cretaceous period (Upper Barremian ~120My, as measured by Steuber and Rauch, 2005) also known as the Urgonian (-115; -125My) type series. Orgon limestone as produced and commercialized (powder supply by Omya France SA, Orgon, Bouche-du-Rhone, France) was named in this work as Orgon U. It is a peloidal grainstone with foraminifers. It contains large

fossils mostly found in a toppling situation (Masse, 1995). We also analyzed a level of the quarry with a high content of these rudists (named as Orgon T). Finally, we conducted the diagenesis analyses on the rudists itself: Mollusca, Bivalvia, Hippuritoïda *Requienia ammonia*, Urgonian. They lived as sessile, epi-benthic suspension feeders in shallow-subtidal marine tropical or subtropical environments (Ross and Skelton, 1993). The control sample used in this work belongs to the order Ostreida. Mollusca: Bivalvia, Pteriomorpha *Pinctada margaritifera*, from French Polynesia. Mother-of-pearl layer was extracted and ground. It was named in this work as 'nacre'. Rectapur is the negative control used in this work (pure commercial CaCO₃).

Sample preparation

The Orgon limestone was decarbonated to analyze the insolubles. 50g of powdered sample (particle size < 100 µm) have been suspended in 250ml of ultra-pure water with continuous stirring during 24 hours. The suspension was then centrifuged and the centrifugation sediment has been collected for decarbonation. To this latter, HCl 2N had been added drop by drop as long as pH>4. After centrifugation and filtration, the filtrate was named acid-soluble matrix (OrgonAS). The residue of the filtration was called acid-insoluble matrix (OrgonAI). This fraction was further analyzed by X-ray diffraction and IRTF.

Techniques

Thin polished sections (petrography type) have been prepared for optical microscopy in polarized light and epifluorescence (Leitz, equipped with a mercury-vapor lamp). Scanning Electron Microscopy was performed on fresh fractures of the rudist shells, Au/Pd coated and analyzed with a Hitachi S4500 FEG-SEM/EDS/Cryo in Orleans University.

Transmission electron microscopy was performed on ground samples of the fossil shell. The powder was dispersed on water and recovered on carbon-coated grids. Observations were conducted on a Philips CM20/Edax at Orleans University. The diagenetic state was observed by cathodoluminescence: emission of light from a solid induced by an accelerated electron beam. It was performed on the cold cathod microscope and spectrophotometer (330-900nm) of GEGENA2 at Reims University.

The Rock-Eval analysis (Rock-Eval 6 Turbo, Vinci Technologies, France) gives the total organic carbon content (TOC) and the total mineral carbon content (CMin) by heating samples in an open pyrolysis oven under argon (Bourrat *et al.*, 2007). An analysis takes place in 2 steps. First, during a pyrolysis under nitrogen, a desorption of hydrocarbon is maintained at 200 °C for 5 min. Then, the pyrolysis occurs between 200 and 650°C at 30°C min⁻¹. The departure of hydrocarbons is recorded by a flame ionization detector (FID). At the same time infrared cells detect CO and CO₂ corresponding to the release of functions linked to organic molecules. At higher temperature above 550°C, it records the CO₂ released during lime formation. Peaks integration provides the amount of organic as well as mineral carbon of the sample (Bourrat *et al.*, 2007). Second, the residue recovered after pyrolysis undergoes a combustion in a second oven from 400°C up to 850°C, under artificial air (N₂ : O₂, 80 : 20). CO and CO₂ released are recorded on line by means of infrared cells.

The global composition of the samples and that of the OrgonAI fractions were determined with X-Rays Diffraction. The apparatus used was a diffractometer INEL XRM3000 in transmission with an INEL CPS 120 detector.

Each sample was then used for analysis of elemental concentrations by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Samples were finely ground and dried at 105 °C in an oven. The concentrations of major elements were determined after alkaline fusion. For this method a 500 mg mass of LiBO₂ flux was added to 100 mg of sample. The whole sample was placed in a carbide crucible and fused to obtain a glass bead. Then, this latter was dissolved in a 100 mL volume of diluted HNO₃. Each sample was measured in triplicate with mean standard deviation less than 2 %. Concentrations were calculated from line intensities in comparison with certified reference materials (rocks).

The thin polished sections used for microscopy were analysed by EPMA quantitative analysis (Electron Probe Micro Analysis; CAMECA SX 50, equipped with 5 spectrometers): Mg, Sr, Fe, Na and Mn were recorded in the same time and mapped on 3x3mm² area with a 512x512 pixels resolution.

Finally, infrared spectroscopy was monitored in the 400-4000 cm⁻¹ wave number range with a spectral resolution of 4 cm⁻¹ using a NICOLET Magna-IR 760 spectrometer. The classical pellet preparation was used: the sample was finely ground in an agate mortar and 1 to 1.5 mg of the resulting powder was mixed with KBr, previously dried at 120°C for 24 h, to make a 150mg pellet. The mixture was homogenized and pressed in an evacuable die to prepare a 13

mm diameter pellet. The operating conditions were 128 scans, 2 cm^{-1} resolution over the 400–4000 cm^{-1} range without ambient H_2O and CO_2 correction.

RESULTS

1. Petrography

The petrography of Orgon limestones has been studied in detail by Masse. The chalky limestone is composed of peloidal grainstones with miliolids. Mudstones (or wackestones) are rare and preferentially associated with indurated levels that punctuate the succession (about 100m). ‘High energy’ facies exist locally but have a very limited expression (rudstones). Figure 14 is a SEM micrograph of the outer broken edge of a shell showing large sparry crystals of the fossil external layer adjacent to the peloidal sediment.

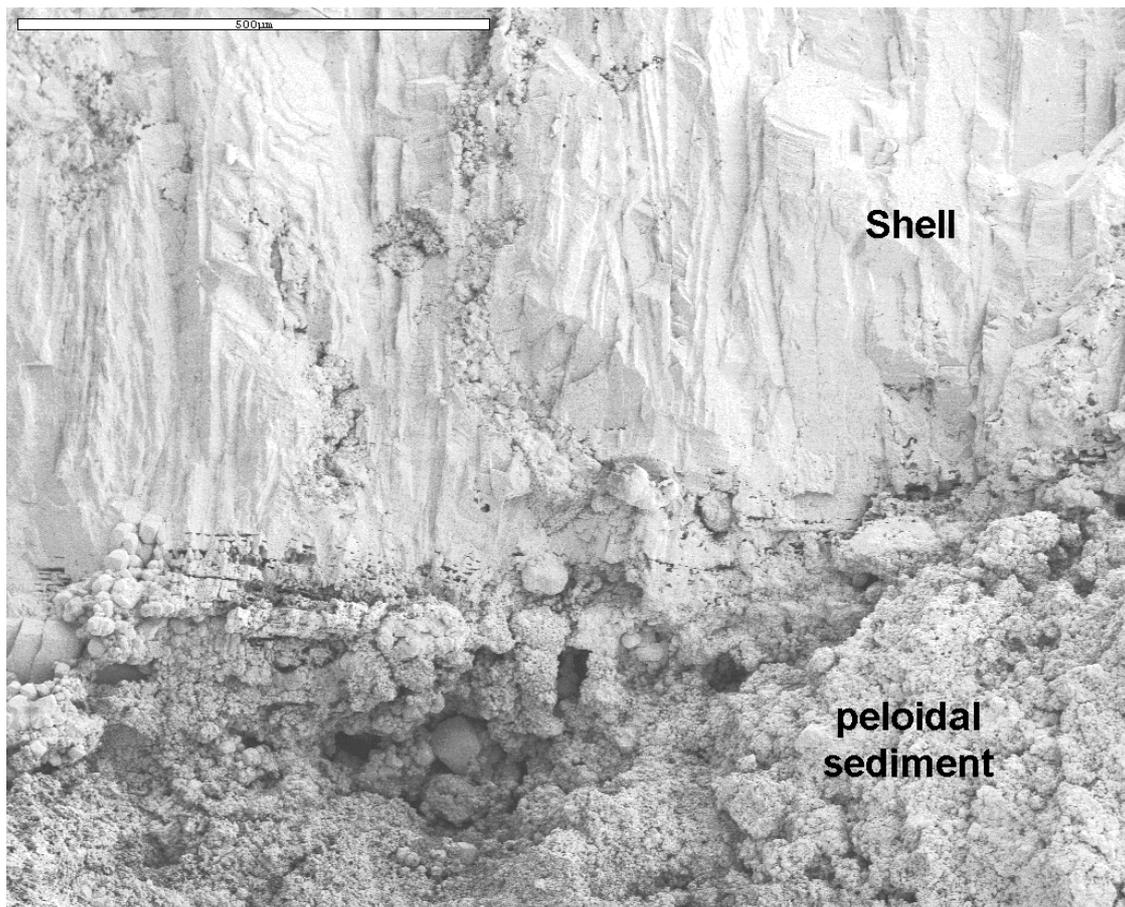


Figure 14. SEM secondary electron micrograph of a shell of *Requienia ammonia* with large palissadic sparry calcite (shell on top) and adjacent peloidal sediment.

The limestone was analyzed by XRD. Spectra exhibited pure calcite. IRTF also show the specific carbonate vibration peaks of calcite exclusively, either with Orgon U, Orgon T or commercial Rectapur calcite: ν_4 at 713 cm^{-1} (in-plane bending of CO_3^{2-}), ν_2 at 880 cm^{-1} (out of plane bending of CO_3^{2-}), ν_3 at 1420 cm^{-1} (anti-symmetric stretching mode CO_3^{2-}) as well as harmonic and combination modes such as 1780 cm^{-1} (harmonic of 880 cm^{-1}), 2508 cm^{-1} vibrations combination 2854 , 2925 and 2958 cm^{-1} . After decarbonation, the acid insoluble fraction (OrgonAI protocol) was analyzed by XRD and IRTF to determine the minor minerals: the main one is kaolinite. Quartz is also visible. Traces of plagioclase and potassic feldspath are also identified. In the OrgonAI residue, iron is present as goethite oxide. In order to complete the chemical composition, ICP-AES analyses were carried out (Table1).

<i>Samples</i>	<i>Orgon U</i>	<i>Orgon Shell</i>	<i>Orgon shell Steuber&Rauch, 2005</i>	<i>Pinctada nacre (control)</i>
	% oxide	% oxide	% oxide	% oxide
<i>SiO₂</i>	0,59	2,06	n.m.	0,56
<i>TiO₂</i>	0,01	0	n.m.	0,01
<i>Al₂O₃</i>	0,19	0,36	n.m.	0,1
<i>Fe₂O₃</i>	0	0,15	0.019	0,69
<i>MnO</i>	0	0	0	0
<i>MgO</i>	0,14	0,17	0.09	0,06
<i>CaO</i>	54,16	52,03	n.m.	52,29
<i>Na₂O</i>	0,07	0,15	n.m.	0,85
<i>K₂O</i>	0,05	0,17	n.m.	0,08
<i>P₂O₅</i>	0,01	n.d.	n.m.	n.d.
<i>SrO</i>	n.d.	n.d.	0.11	n.d.
<i>Fire Loss</i>	42	43,91	n.m.	45,22
<i>Total</i>	97,21	99	n.m.	99,86

Table 1. Composition of major, minor and trace elements in Orgon U, a shell of *Requienia ammonia* and the control sample (*Pinctada Margaritifera* mother of pearl layer) analyzed by ICP-AES. For comparison, the analysis of a rudist shell is given (Steuber and Rauch, 2005). n.d. means non detected and n.m. not measured.

As expected, calcium is obviously the main element in Orgon U. Magnesium is low; it is in line with the low-magnesian calcite nature of the rudist outer layer (see below, EPMA analysis). Calcium level is lower in the control sample, because nacre contains up to 1.8% organic matrix. Partly for the same reason, the shell sample contains less calcium; its organic content is 3 times higher than the one of the bulk rock (see Rock Eval data, next paragraph). The other reason is that silicon and aluminium are also higher inside the fossil shell. Kaolinite

($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) was evidenced by XRD and IR spectroscopy after decarbonation. Kaolinite was considered as a detrital material (Chamley et Masse, 1975). Calculation has shown that aluminium is not sufficient for bonding all the silicon under the form of kaolinite. An excess of silicon is appearing in the shell. Our hypothesis is that shells were enriched in silicon with the diagenesis fluids during the transformation of the initial (low-magnesium) calcite into the diagenetic low-magnesium calcite: LMC \rightarrow dLMC. Silicon was then entrapped in the inclusions associated with the organic matter. Sodium was also measured: it was possible to identify NaCl trapped as inclusion in the primary cement of the shell by SEM and EPMA. All the values obtained in this work are in line with those published in the literature for *Requienia* (Orgon) (Steuber and Rauch, 2005). Compared to other Urgonian deposits in South-East of France (Machhour *et al.*, 1998), Orgon is the site with the highest chemical purity.

Finally, the total organic matter of the rock was quantified by Rock-Eval pyrolysis. Three different samples were analyzed 4 to 6 times each. The first one was the bulk rock: it gave a total organic carbon (TOC) value equal to 200g/ton. Then, the enriched-rudist beds of the Orgon quarry gave a TOC value equal to 300g/ton. The third sample was the *Requienia* ground shell: the value obtained was 550 to 600g/ton. A carbon content of 600g/ton in the shell, represents about 1500g/ton of organic matter, taking into account C but also H, O, N and S (calculated by comparison to the composition of chitin). Bioclasts and above all rudist fragments, concentrate most of the organic matter present in the rock. Finally, it is interesting to evaluate the residual organic content in the bioclasts. This concentration can be compared to the 7200g/ton of TOC found in the nacre control sample: this makes approximately 8,5% of residual organic content left in the shells at Orgon.

2. Diagenesis

The limestone of Orgon contains large requieniid rudists. The observation of thin sections of the shells shows a very homogeneous rock. Figure 15 is a section across the *Requienia*'s shell as seen with cathodoluminescence (CL). The external peloidal sediment can be observed on the right side of figure 15 with a brown CL color. On the left is the internal packstone found in the main cavity of the fossil.

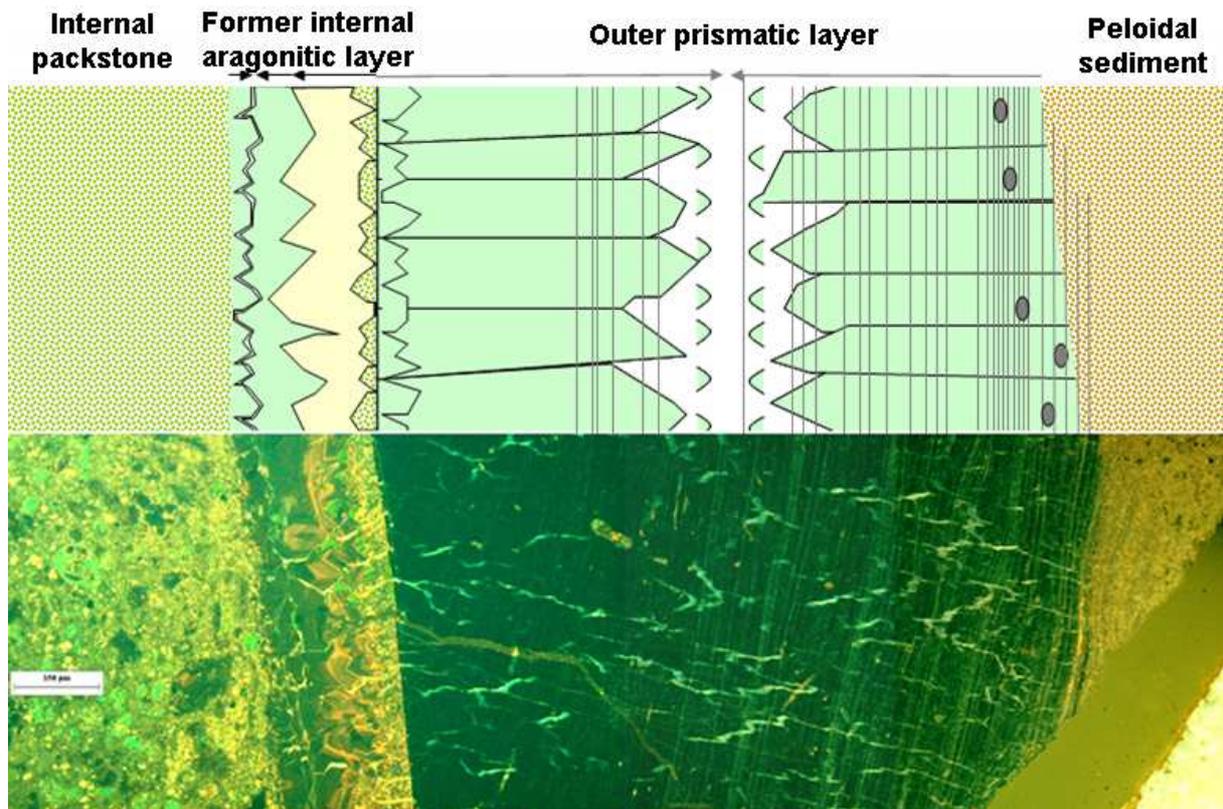


Figure 15. Cathodoluminescence emission of a *Requienia ammonia* shell(back). On top, schematic of the interpretative scenario of the diagenesis (scale is 350µm).

The analysis of rudists allows to specify the conditions of diagenesis and to define the conditions of storage of the organic matrix they retain (*Requienia ammonia*, *Toucasia carinata* but also some gastropods such as *Nerinea Gigantea*, etc...). At the death of the animals, the internal aragonitic layer dissolves; the existence of this layer is clearly established in the Requieniidea (Al-Aasm and Veizer, 1986) and other rudist bivalves. Here, only the outer prismatic layer of calcite is preserved: it appears very weakly luminescent (dark green in Fig. 15). This layer is made of large sparry crystals. We observed in transmitted polarized light, that this layer underwent a centripetal recrystallization. These observations are illustrated in Figure 16 that shows zigzag features along the sparry crystals. A ‘dissolution/precipitation’ recrystallization occurred according to a double front: see the arrows on schematic of Fig.15. It is a diagenetic very low magnesium calcite: LMC → dLMC as asserted by the EPMA analyses (see below). The centripetal mechanism supposes a weak diffusion of elements.

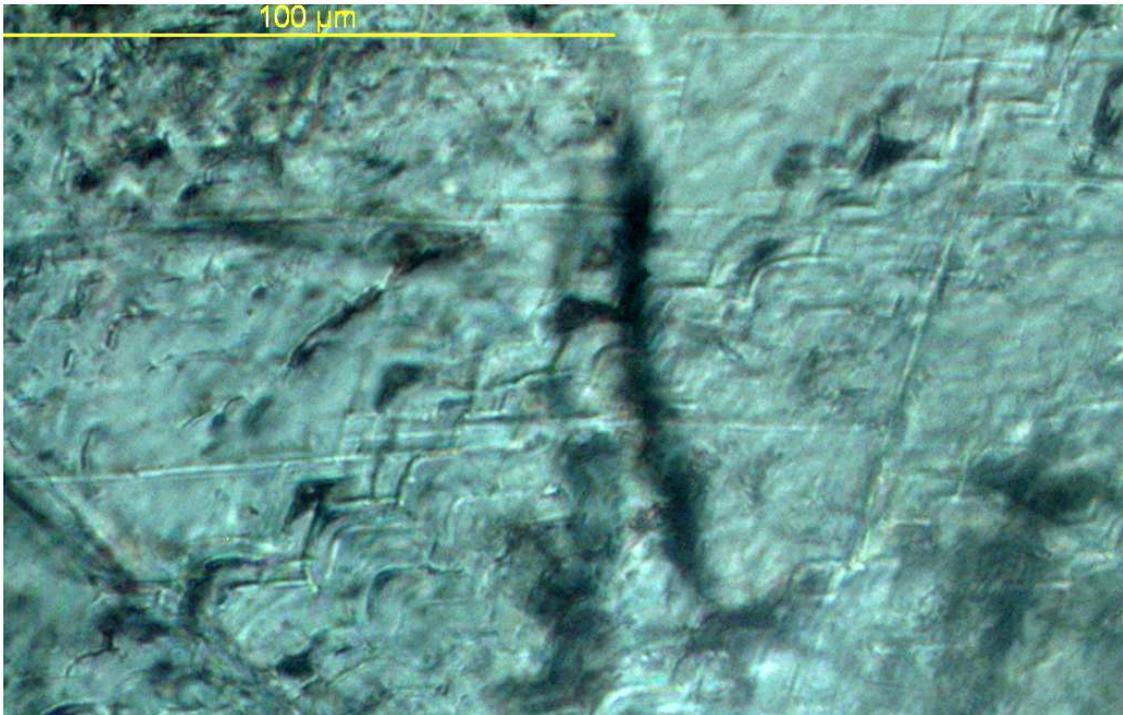


Figure 16. Outer layer of Requienia ammonia observed with polarized light (dLCM) : Chinese hat-like features are seen in the center of the prismatic calcite crystals.

Many tracks of 'borers' are visible in this shell layer. They occurred after the neomorphic recrystallization (dLMC). This is illustrated in Figure 17: the hole was carved from the empty body cavity. The internal aragonitic layer was already totally dissolved because the borer dug into the prismatic dLMC crystals. In this case, the burrow was filled with the same packstone as that in the main cavity of Requienia, characterized by an orange micritic cement.

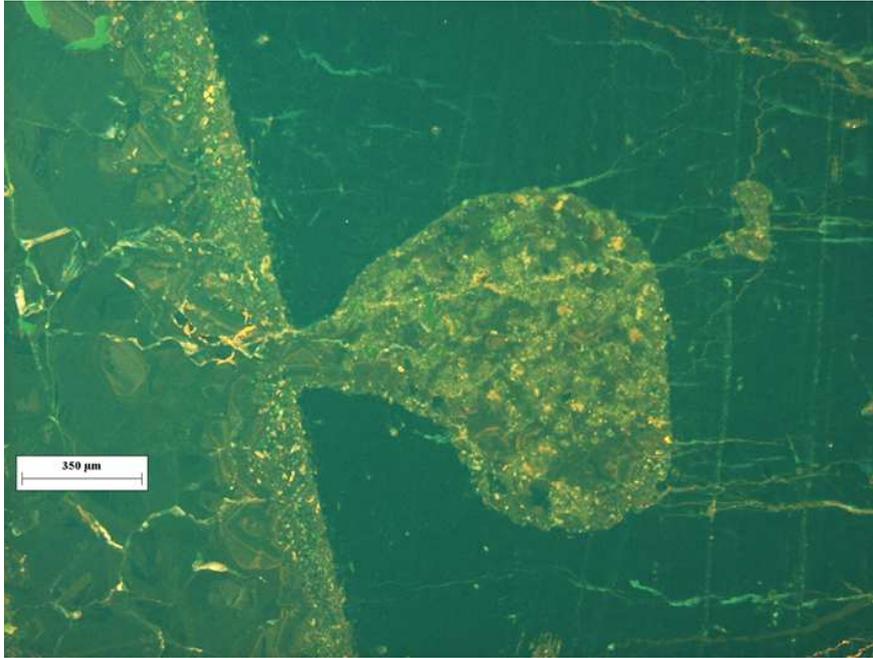


Figure 17. Evidence of endolithic faunas tracks. In this example: from the internal cavity, inside the outer dLMC layer (the internal layer was dissolved and the recrystallization of the outer layer already done) (scale is 350 μm).

The filling of cavities is composed of shelly sand (light green) more or less fine depending on the case, which undergoes a subsequent cementation more magnesian, with an orange luminescence as shown in Fig. 15. A higher magnification is given in figure 18, joined bioclasts are visible in the filling: in particular numerous recrystallized fragments of bivalves, few foraminifers (*Sabaudia*?), peloids, etc... They are linked by a fine micritic matrix (early cementation); the cavity illustrated in figure 18, is characterized by a high amount of sparitic dark cement (final cementation). Green light color is that of the pores (embedding resin). They are located inside the clasts, probably related to a flushing by fresh water during the diagenesis and responsible of the chalky texture of this limestone.

The filling and consolidation of the internal cavity was followed by a shrinkage that opened many fenestrae. The main one was parallel to the edge of the outer layer. A secondary cementation occurred by waves. It formed a luminescent drusic spar with orange and green spectra: magnesian at the beginning and less and less thereafter (see EPMA, below). This episode occurred without completely closing the cavities. The end of the fenestrae cementing occurred with the filling of dark green sparry cement similar to that of the dLMC. This was a centripetal deposition of sparite large crystals in the double inner layer. This last cementation also filled the residual porosity inside the packstone of the cavities as shown in Fig. 17.

Finally, recrystallized cracks are noticeable: they crossed all these calcitic structures at the interface of crystals; they even go through the different layers with a very light-green fluorescence (Fig. 15).



Figure 18. Internal bioclastic sedimentation (foraminifers, miliols, entroques) observed with cathodoluminescence: microfossils (green), primary micritic cement and endoclasts (orange) and secondary sparitic cement (dark) (scale barre is 250 μ m).

Analyses carried out with EPMA confirmed the results obtained above (Figure 19). In this figure, the field of interest is a similar area as in figure 15, but rotated at 90°: the outer shell is on the top, the double layer is in the center and the packstone inside the empty body cavity is at the bottom. The main feature which appears with EPMA data is the good matching of the Mg map with the cathodoluminescence images (manganese is completely absent and does not explain the contrasts, not shown). Mg is above all visible in the cement of the cavity and in the drusic sparite at the beginning of the *fenestrae* filling. Its concentration is very low in the prismatic layer: all the Mg it contains is gathered as spotty inclusions, associated with Na and Fe (not illustrated), probably within organic inclusions. The outer shell is a low-magnesium calcite: dLMC. Sr and Na are very scarce in the rock. They are a little bit more abundant in the outer shell. Some traces of Na are also observable inside cracks parallel to the internal layer.

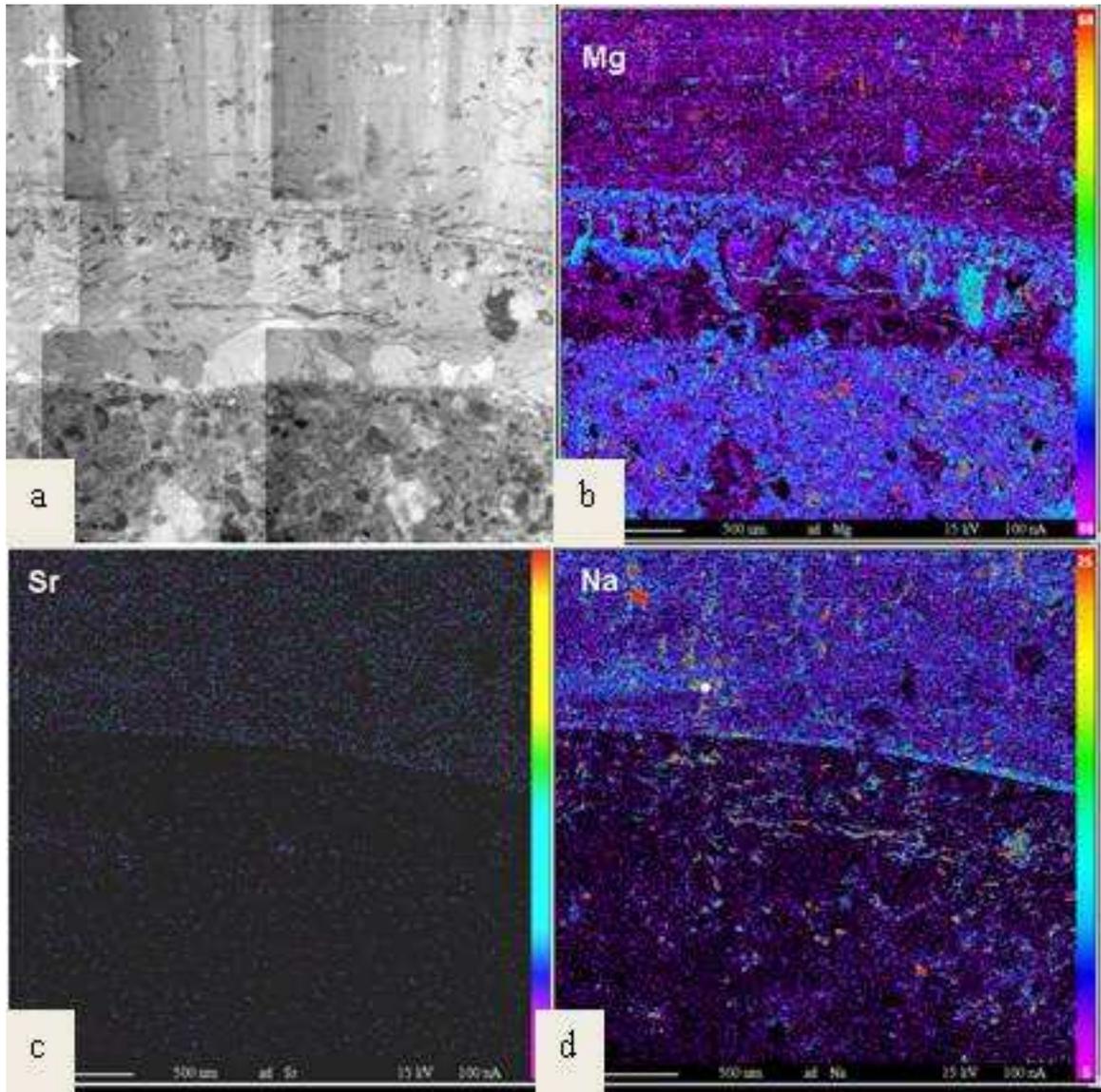
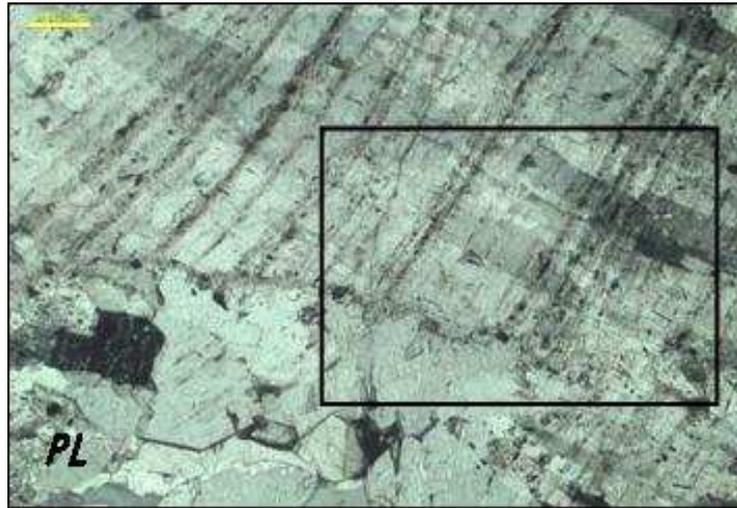


Figure 19. EPMA elemental mapping across the shell of *Requienia ammonia*, same area as in Fig.15 (a): optical image with outer layer on top and internal filling in the bottom; (b): Mg; (c): Sr and (d): Na

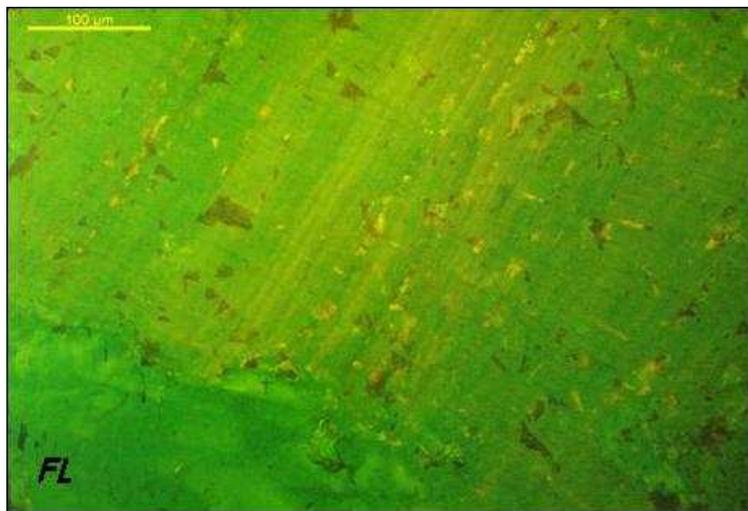
3. Organic matrix evidence

In order to check if the shells of *Requienia ammonia* still contain organic matter after the diagenesis, they have been observed by different techniques. Figure 20a shows an example of a typical image obtained by optical microscopy in polarized light (this zone is close to a track of lithophagous dug into the shell and filled with large spar crystals during the late cementation) (the bottom left quarter of the image). The optical microscopy shows clearly the fibrous large prismatic calcite crystals perpendicular to the surface, sometimes called palissadic crystals. It also shows growth features observed by the authors across the prismatic crystals (Masse and Philip, 1972; Steuber and Rauch, 2005). Figure 20b is the enlargement

corresponding to the square of the first picture, obtained with UV illumination (epifluorescence optical technique). In these illumination conditions, calcite is known to produce a primary fluorescence in light green. The alignments are seen to fluoresce in yellow, sign of their organic nature. Small inclusions are also clearly fluorescing in yellow: that could be the soluble organic matter dissolved and gathered as ‘fluid inclusions’ in the calcite crystals (dark features are artefacts: cleavages, pores or empty cavities due to the polishing of the sample).



a



b

Figure 20. a. Optical microscopy image of the shell of *Requienia ammonia*. b. epifluorescence of the squared zone of a: calcitic crystals fluoresce in green, pores in blacks and the organic matrix in yellow (PL: polarized light; FL: ultraviolet illumination; scale bars are 100 μ m).

The shells of *Requienia ammonia* were also observed by scanning electron microscopy (SEM, Figure 21a). In order to prepare the sample for SEM observation, a fracture is produced across

the *Requienia* fossil. As expected, the fracture surface clearly shows the prismatic crystals from the bottom to the top of the image. But more intriguing, this technique also shows the growth lines at the surface as arrowed on figure 21a. But why do the growth lines produce marks on the fracture surface? They correspond to what is expected from the fracture mechanics of a ‘composite material’ with two different phases (see eg, Evans and Marshall, 1989). To understand what happen it is necessary to give a sketch of the situation when preparing the sample. Figure 21b shows the propagation of the fracture across the calcite crystals. Calcite behaves as a brittle material. In the present case, the crack propagation crosses a series of ‘films’ with a different composition and a different rheological behaviour: elasto-plastic behaviour. When the crack impinges the films, part of the energy is absorbed and the crack is deflected at 90° along the interfaces (half arrows in Fig.21b). Sometimes it pulls out the film as clearly seen on figure 21a. The other part of the energy goes through the film in the main direction (crack front). These alignments behave as expected for organic films and not simple marks in the mineral. These features can be seen in other reports (e.g., Steuber and Rauch, 2005).

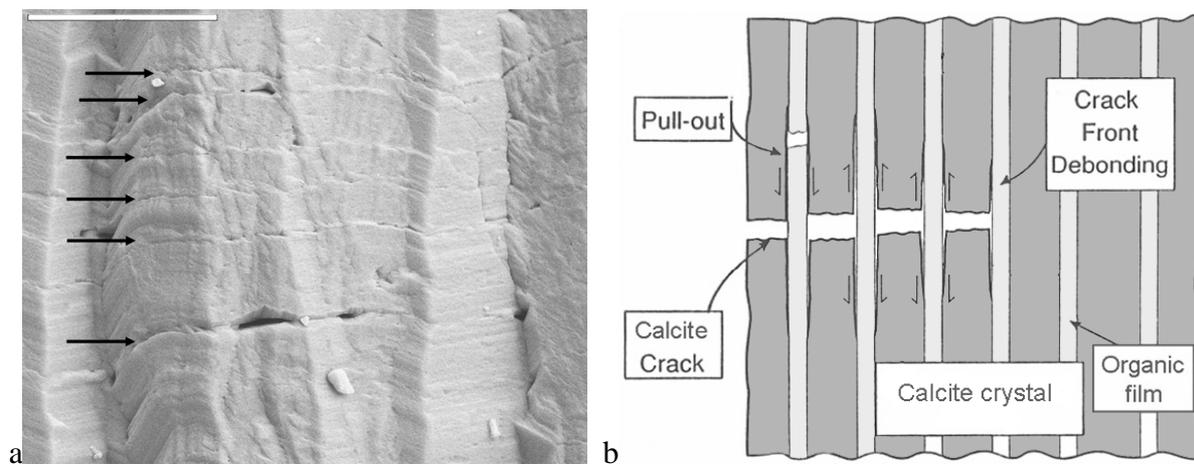


Figure21. Outer shell layer of *Requienia ammonia*. (a): SEM secondary electron image of the fracture surface (scale barre is 10 μ m) and (b): schematic in cross section showing the crack propagation within calcite with deflection at each film interface producing the typical surface features seen with SEM (arrows in a: trace of film).

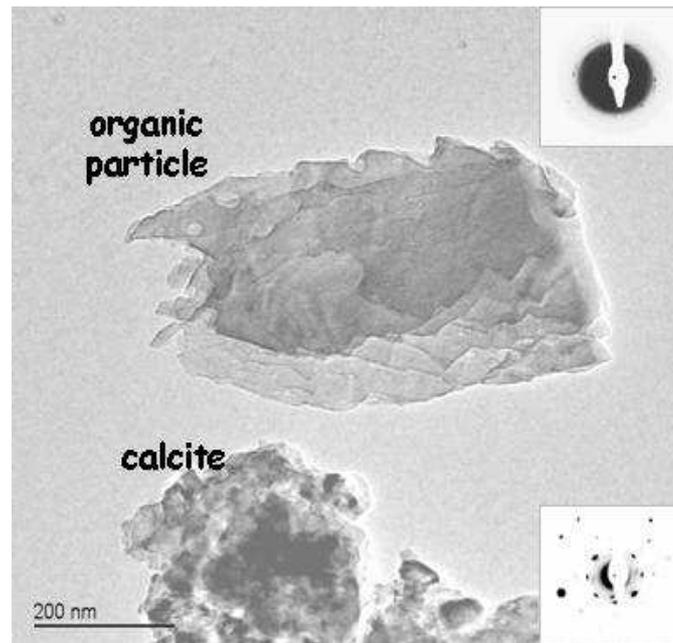


Figure 22. Transmission Electron Microscopy of grinded shell. Flat particles exhibit typical amorphous organic diffraction pattern. The most abundant particles of the shell are calcite grains with their typical crystalline diffraction pattern.

The organic nature of the film was double checked by transmission electron microscopy (TEM). The sample is first ground and then dispersed onto a TEM carbon coated grid. Two distinct particle-types were identified (Figure 22). The most abundant one is calcite with a typical crystalline diffraction pattern. The second one has a flat morphology and an amorphous electron diffraction pattern: it shows large rings and a strong diffusion central peak, all features expected for organic matter. These flat organic chips may correspond to the films responsible for the alignments evidenced as growth lines in optical and SEM images. This is another evidence to assert previous findings. Their location across the neomorphic prismatic calcite crystals is the sign that they are notably insoluble and corresponding to the interlamellar organic matrix of the biocrystal. That type of compartments is made up of polysaccharides, proteins and other organic molecules. (eg, Voss-Foucar, 1968). Thus growth features observed by the authors are real and correspond to the successive compartments of biomineralization of the shell.

DISCUSSION

The limestone extracted in Orgon shows that the detrital contribution is negligible in Orgon. The geochemistry was finely analyzed by Steuber and Rauch (2005). In Orgon, Barremian seawater is low in magnesium and low in strontium. In shallow seawater, the redox conditions cause the dissolution of calcareous tests. Masse et coll. suggested that the bioerosion of rudists is different from that of corals, more prone to generate muddy fractions than sands (Masse and Fenerci-Masse, 2006). The role of microborers, clinoid sponges and heterotrophic microorganisms is often suggested as responsible for that form of CaCO_3 production, *i.e.* the formation of muds (Neuweiler *et al.* 1999).

This limestone contains well preserved rudist specimens. Rock Eval pyrolysis has shown that these fossils concentrate almost exclusively the organic matter: up to 600g/tonne of TOC (total organic carbon). This represents approximately 1500g/tonne of organic matter still present in the rudist shells. Different techniques were used to locate and characterize this organic matter. Epifluorescence has shown that the growth lines observed by the authors are the former organic walls of the compartments left by the biomineralization process. These organic compartments are precisely described by specialists in the biocarbonates; they are polysaccharide frameworks (acid insoluble). They remained virtually in place during the recrystallization of the outer prismatic layer.

But what about the soluble organic content of the biocrystals? In the example of nacre, it is known that soluble organic content is more ‘intracrystalline’ and composed of proteins, glycoproteins and lipids (Levis-Kalisman *et al.*, 2001). Presumably, it was dissolved and trapped during the recrystallization of the neomorphic calcite as primary inclusions in the new crystals. Only part of the soluble organic matrix was retained. We can estimate that the total organic content is about 8,5% of the original content, by reference to a biocarbonate as nacre.

The biocarbonate production of the rudist colony was important, since annual skeletal growth rates were up to several cm (Steuber, 1996; 2000). So there was a mass production of organic molecules, but almost all of this production was supposedly lost by dissolution of shells and formation of mud. This biomass has surely provided the trophic reserve for the biocenosis of this close system.

Our concern in this work is to assert the origin of organic matter present in that type of limestone: the residual organic content cannot be detrital but inherited from biomineralization. Fossils concentrate almost exclusively the organic matter and this is by all evidence, the organic matrix of the biocarbonate itself which is conserved. The deposition conditions are oxidizing. This guarantees the absence of contamination by any detrital biomass. The process of sedimentation constitutes a selective storage of molecules. Our results show that the mechanism of recrystallization of the rudists shell in Orgon is the centripetal 'precipitation / crystallization' mechanism, inconsistent with any organic incorporation. This is coherent with the literature: the possibility for carbonate to incorporate detrital organic matter was studied by Ramseyer *et al.* (1997) and by Neuweiler *et al.* (1999) in the case of mud mounds. These conditions of diagenesis are decisive for pharmacological application (Dissaux *et al.*, in prep).

CONCLUSION

Orgon limestone is a very pure calcium carbonate with more than 99.5% of non magnesian calcite. Other elements: Si, Mg, Al, Na, K and organic matrix represent less than 0.5% of the bulk rock. Organic matter is mainly occluded in these massive fossils and bioclasts. The COT content of the rock is 200 to 300 g/ton corresponding to the calcifying organic matter at the origin of the biomineralisation of the carbonate. They represent a COT of 600g/ton in the thick bioclasts, i.e. approximately 8.5 % of the initial content. Only the calcitic outer layer has been preserved with its organic content. Two forms were recognized: the 'growth lines' described by the authors and organic inclusions inside the neomorphic calcite.

The examination of the diagenesis of the rudists has shown that the calcifying matrix has undergone the early process of neomorphic recrystallization of the prismatic layer: a centripetal dissolution/precipitation mechanism which supposes a weak diffusion of the trace elements and organic content. The shallow sea water conditions are oxidizing. The thick rudist shells have survived in these conditions but only the outer layer calcitic part; the aragonitic internal layer (nacre) is systematically dissolved. This process guarantees the origin of the organic molecules entrapped in this limestone; they are molecules involved in the mediation of calcium in the biomineralization process. These molecules represent a potential source of active substances for osteoporosis or for skin care applications.

CHAPITRE IV :
Les Calcaires Urgoniens, une source de
Protéines et de Lipides

IV.1. Résumé de la publication 2

Dans cet article, nous avons tout d'abord extrait ces molécules à l'aide de 4 protocoles distincts ; une extraction douce à l'eau avec laquelle on obtient OrgonW, une extraction lipidique à base d'éthanol avec laquelle on extrait OrgonE, et une décarbonatation à l'acide chlorhydrique avec laquelle on obtient, d'une part, l'extrait acido-soluble OrgonAS et d'autre part, l'extrait acido-insoluble OrgonAI. L'extrait OrgonW a également été décarbonaté afin d'éliminer le carbonate de calcium et ainsi de concentrer la matière organique : cet extrait est nommé OrgonWa. Tous les extraits ont ensuite été dialysés contre de l'eau milliQ à 100-500Da, ceci afin de les dessaler (Tableau 2). Ils ont ensuite été analysés. Les minéraux traces ont été quantifiés par les spectroscopies d'absorption atomique et infrarouge, techniques qui confirment une calcite extrêmement pure (Tableau 3). Les spectres infrarouges ont révélé la présence de sucres (Dauphin, 2002) et de liaisons amines et amides, liaisons caractéristiques de la présence d'acides aminés (Figure 23).

Nous nous sommes donc appliqués à démontrer que les coquilles de rudistes renfermaient encore des protéines. Pour cela, une analyse HPLC en gel filtration a été réalisée (Figure 24): les chromatogrammes nous montrent de nombreux pics correspondant essentiellement à des molécules, supposées protéiques, de petites tailles. Une analyse des acides aminés a révélé parmi tous les extraits qu'OrgonWad est celui qui contient le plus d'acides aminés (Figure 25) (abréviations annexe 8). Les spectres de composition en acides aminés présents dans les extraits d'Orgon, sont proches de ceux de la nacre actuelle qui nous sert de référence. Ce sont essentiellement des hydrophobes aliphatiques, les aromatiques sont présents en faible proportion dans les deux cas. La seule différence à noter est la forte présence de la proline dans les extraits d'Orgon. La similarité qualitative est considérée comme le gage d'une bonne préservation des molécules organiques (Matter *et al.* 1969, Curtis and Krinsley, 1965). Nous avons ensuite expérimenté la méthode de Bada et Schroeder (1972) qui consiste à mener une analyse en acides aminés sans hydrolyse (Figure 26). Ceci nous a permis de démontrer que les molécules organiques contenues dans les extraits sont sous forme de polypeptides et non d'acides aminés libres. Enfin, une électrophorèse a été réalisée afin de déterminer la taille de ces protéines. L'échantillon le plus prometteur a été dilué pour obtenir quatre concentrations différentes puis analysé : c'est l'échantillon OrgonWd qui d'après le test BCA concentre le

plus de protéines (tableau 4). Quatre bandes ont été mises en évidence en SDS-PAGE⁹. Ces bandes sont de mieux en mieux révélées avec des concentrations élevées : elles correspondent donc à des protéines (Figure 27). Elles apparaissent à 12, 18, 20 et 35kDa, ce qui confirme la présence de petites protéines au sein des coquilles de rudistes d'Orgon. Des analyses protéomiques ont été poursuivies par des analyses au MALDI-TOF et montrent qu'il s'agirait bien de séquences typiques de protéines marines; mais pour le moment ces résultats sont encore à la limite de fiabilité de la technique.

Les lipides ont également été analysés par grande famille et feront l'objet des suites de ce travail (Figure 28). Les familles de lipides identifiées démontrent un fort pourcentage de squalène et la présence d'acides gras et de stérols pour les deux extraits OrgonE et OrgonW. Les résultats obtenus montrent des similarités avec les lipides identifiées dans la nacre actuelle (Rousseau *et al.*, 2006).

Nous pouvons donc conclure que le calcaire d'Orgon a subi une diagénèse douce (dissolution/précipitation centripète sans diffusion) étant donné qu'il renferme encore de nos jours de petites protéines. Les protocoles mis au point dans ce travail laissent penser qu'une extraction industrielle de ces molécules est possible. Avec les réserves actuelles de la carrière, 100 tonnes de protéines pourraient être extraites ainsi que 1450 tonnes de lipides de biominéralisation. Ces molécules pourraient être utilisées à des fins pharmaceutiques et dermo-pharmaceutiques comme cela va être démontré dans les deux chapitres suivants.

⁹ Je remercie l'équipe d'Hélène Benedetti pour leur aide précieuse dans la mise au point de la technique du SDS-PAGE.

IV.2. Publication 2: Limestones, a source of proteins and lipids

Aurore Dissaux¹, Xavier Bourrat¹, Pascale Gautret¹, Jean-Michel Beny¹, Evelyne Lopez², Jean Trichet³

¹ ISTO, Université d'Orléans/CNRS/Université François Rabelais-Tours (UMR 6113), Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 45072 Orléans cedex, France.

² Museum national d'Histoire Naturelle, BOREA (CNRS/MNHN UMR 7208), 43 rue Cuvier, 75231 cedex 05 Paris, France.

³ 391 rue de Lorette, 45160 Olivet, France.

Corresponding authors: Aurore Dissaux, Aurore.Dissaux@gmail.com, (33) 02 38 49 27 65; Xavier Bourrat, Xavier.Bourrat@univ-orleans.fr, (33) 02 38 49 40 93, Fax. : (33) 02 38 63 64 88.

Keywords : amino acids, HPLC, IRTF, lipids, peptides, total organic carbon

ABSTRACT

In this work, we show that proteins and lipids as old as 120My can be extracted from the Cretaceous limestone in an Orgon quarry (France). These residual organic molecules were associated to calcium carbonate biominerals in rudists' shells. Rudists have formed bioconstructions at the edge of the Barremian Tethys Ocean. The total organic matrix was extracted according to various protocols: extraction with water or ethanol or extraction by decarbonation. Conventional techniques were used to reveal the presence of proteins: infrared spectroscopy, amino acid analysis, HPLC, bicinchoninic acid test and SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis). The latter confirms the presence of small proteins (10-35kDa). Lipids were also identified. Rudists represent an ideal 'carbonate factory' and then, their shells an efficient 'sarcophagus' for organic molecules involved in biomineralization. As such they are a potential source of molecules with pharmaceutical interest amounting to 100 tons of extractable proteins and 1450 tons of lipids, in the bulk deposit.

INTRODUCTION

Amino acid analyses of fossil shell organic matrices have long been performed to check the degree of fossil alteration (Abelson, 1955; Gregoire, 1959). Abelson (1955) recognized the potential value of utilizing fossil organic material to study biologic evolution directly from the fossil record and has been the first to report the presence of preserved amino acids in fossil shells as old as about 360Ma (Abelson, 1954). According to this author, the free amino acid content in *Mya myarenaria* and *Mercenaria mercenaria* shells changed only moderately in samples ranging from 30 to 1 Ma in age (Abelson, 1955). Matter *et al.* (1969) analyzed the protein residues recovered from fossil oyster shells dated from Pleistocene to Cretaceous and showed that the same amino acids are present in current proteins but in different proportions. According to this author, the differences in composition are attributed to a progressive denaturation of proteins that were very similar initially. Gregoire (1970) was the first to publish the evidence of proteins in shell. Six years after, Weiner *et al.* (1976) revealed the presence of glycoproteins in a shell of *Scabrotrigonia Thoracica*, an 80 million years old mollusc.

Thanks to more and more sensitive techniques, fossilized DNA was analyzed (Higuchi, 1984; Paabo, 1985) and later on amplified (Paabo *et al.*, 1989; Cano *et al.*, 1993). Numerous specific organic molecules have been found in calcified tissues like collagen, DNA or proteins (Armstrong *et al.*, 1983; Huq *et al.*, 1985). Discussions were conducted to point out their interest in palaeontology and, in particular, their use in establishing a molecular phylogeny (Ambleer and Daniel, 1991). This has been done with success by Organ *et al.* (2008) who revealed that molecular data from long-extinct organisms may have potential for resolving relationships in the vertebrate's evolutionary tree. Biogeochemical studies have also been undertaken on the diagenetic transformations of proteins and amino acids in works aiming at the relative or absolute dating of bones, shells and teeth (Hare *et al.*, 2002) but also to be used as archives of geochemical proxies (Veizer *et al.*, 1999). Recently, scientists have been able to obtain the sequencing of fossil collagen proteins from *Tyrannosaurus Rex* and *Mastodon* (Asara *et al.*, 2007).

The preservation of organic matrices occluded in biocrystals has now long been studied (Trichet and Défarge, 1995; Perrin, 2004). The authors showed that the total organic content decreased quite fast in scleractinian corals because of the high porosity of the dead skeletons (Cuif *et al.*, 1997, Cuif *et al.*, 1999). However, the intracrystalline organic matter may be better protected from diagenesis than the non-intracrystalline organic matter (Ingalls *et al.*, 2003). On the contrary, bivalves and especially rudists' shells, may be ranged in the category of structures characterized by a high degree of stability (Hall and Kennedy, 1967; Al-Aasm and Veizer, 1986; Steuber, 1999). For this reason we chose to study the fate of organic residues in rudist samples in the bioherm of Orgon. In a paper in preparation, we demonstrate that the organic molecules of interest (amino acids, lipids) are occluded in the sparry low magnesian calcite crystals (LMC) of the shells (Dissaux *et al.*, in prep, a).

Our goal in this paper is to study the mass storage and the conservation of these organic constituents in order to proceed to the extraction of proteins and other active molecules displaying pharmacological applications (Lopez *et al.*, 1992; Westbroek and Marin, 1998). Small proteins and lipids, i.e., molecules of interest can be extracted not only from a single fossil but from bulk limestone rocks at industrial scale. Targeted tests revealed such a potential application in particular in dermatology (Dissaux *et al.*, in prep., b, c), in osteoporosis control or in food supplementing (Chang *et al.*, 2007).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The study has been conducted on the chalky limestone of Orgon mined and processed by Omya (Bouches du Rhône, Orgon, France) This site, dating back to the end of Lower Cretaceous (Barremian ~120Ma, Steuber and Rauch, 2005) has given its name to the Urgonian facies (d'Orbigny, 1850). Its diagenesis progressed under oxidizing conditions ensuring that no contamination by detrital residues (Dissaux *et al.*, in prep, a). We sampled in a level of the quarry, remarkable by its richness in shells. This level is named Orgon T. Recent mother-of-pearl samples were used as controls and obtained from the shell of *Pinctada margaritifera* (particle size: 100µm).

Extracts Separation

The Water Soluble Matrix (OrgonW) was extracted from 50g of Orgon T powder (100 μ m) and from 50g of the nacre powder (100 μ m) of the oyster shell of *Pinctada margaritifera*, through a non-decalcifying process, as described in Lopez *et al.* (2001). Briefly, the powder was suspended in 250ml of ultra-pure water under continuous stirring during 24 hours. The suspension was then centrifuged and filtered (22 μ m). The resulting passing-through fraction was called OrgonW. In a second extraction procedure, this extract was acidified with HCl 2N drop by drop as long as pH remained >5. We obtained OrgonWa (acidified water soluble extract). The Water Insoluble Matrix was obtained as the residue after the centrifugation; it was decarbonated with HCl 37% drop by drop down to pH4. The acid mixture was constantly stirred. After centrifugation (4°C, 22 000 g, 20 min), the supernatant was filtered (22 μ m) and freeze-dried. This fraction, named OrgonAS (acid soluble molecules), was used for characterizing organic and inorganic matter and not for protein determination. The residue of the centrifugation was the acid-insoluble matrix, named OrgonAI (acid insoluble molecules). Another treatment consisted in mixing 50g of Orgon with 250ml ethanol and 500 μ l HCl 37% during 24h (Bourrat *et al.*, 2009). The suspension was then centrifuged, filtered (22 μ m) and the filtrate was evaporated and lyophilized. It was named OrgonE (ethanol soluble molecules). All the extracts have been then resolubilised in milliQ water and dialyzed (100-500Da) against MilliQ water and named respectively OrgonWd, OrgonWad, OrgonASd, OrgonAId and OrgonEd (the subscribed 'd' for dialyzed). Finally, they were freeze-dried.

Analytical Techniques

Total organic carbon - Total Organic Carbon (TOC) was measured with Rock-Eval (Espitalié *et al.*, 1985) on the different extracts as well as the mineral carbon involved in carbonates (C_{Min}). It is a pyrolysis technique applied on biocarbonates by Bourrat *et al.* (2007).

Separated Extracts - The composition of the dialyzed samples, OrgonAId and OrgonWd, was determined with capillary devices by X-Ray diffraction. The apparatus used was a diffractometer INEL XRM3000 in transmission with an INEL CPS 120 detector. OrgonASd and OrgonEd, too hydrophilic to be analyzed by X-Ray diffraction, were analyzed by FTIR. Infrared spectroscopy was monitored in the 400-4000 cm^{-1} wave number range with a spectral resolution of 4 cm^{-1} using a NICOLET Magna-IR 760 spectrometer. The operating conditions

were 200 scans, 2 cm⁻¹ resolution over the 400–4000 cm⁻¹ range without ambient H₂O and CO₂ correction. We used the attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-IR).

The elemental constituents (Na, Ca, Fe and Mg) have been characterized in four extracts OrgonW, OrgonE, OrgonAS and OrgonAI by atomic absorption spectroscopy. The apparatus used is a type Z-8100 Polarized Zeeman HITACHI flame spectrophotometer. Na, Ca, Fe and Mg have been quantified. The analytic error is estimated at 1% of the given value.

Protein and amino acids - To characterize the protein content of the extracts the following analyses were carried out. First, the soluble extracts, i.e. OrgonWd, OrgonEd and OrgonWad have been analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) (Thermo Electron Corporation, FinniganTM, Spectra SystemTM) by gel filtration (column Thermo Fisher Scientific, BioBasic SEC-120). They have been firstly dialyzed to get them desalted. A standard (Beckman, amino-acid standard system 7300/6300) was used. Most molecules, including proteins, absorb at wavelengths above the atmospheric oxygen cut-off (185nm). Common mobile phases, water, acetonitrile and methanol are transparent above 220nm. Protein separation was therefore monitored at 226nm, which provides a general detection mode for all peptidic components. The operating software was ChromQuestTM.

Then, amino-acid analyses of those 3 dialyzed extracts have been carried out. The samples were first hydrolyzed with HCl 6N during 24H. Then, the solution has been neutralized by adding methanol, water and triethylamine. The derivatization under the XX form was conducted with PITC (phenyl isothiocyanate) and, finally, the PITC-amino acids were quantified by reverse phase chromatography on a Hypersil C18 column, with an acetonitrile gradient and using a UV detector at 254nm.

OrgonWd, the dialyzed water soluble fraction, has been also analyzed without the hydrolysis step, of the hydrolysis. Indeed according to Bada and Schroeder (1972), this analysis enables to distinguish the free amino-acids from peptidic amino-acids. In this way, we can detect the impact of the diagenesis, *i.e.* if the proteins remain under a peptidic amino-acid molecule that ascertains a mild diagenesis. Nacre water extract was used as a control.

To check the presence and the size of eventual proteins, Sodium-Dodecyl-Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) analyses have been performed. It is a common method for separating proteins by electrophoresis using a discontinuous

polyacrylamide gel as a support, according to the Laemmli's method (Laemmli, 1970). Proteins are denatured with beta-mercaptoethanol and negatively charged with sodium dodecyl sulfate. They migrate on a gel according to their size and a ladder (Precision Plus Protein™ Dual Color, Biorad) enables to determine the size of proteins. Coloration with silver nitrate was used for revelation. OrgonWd was analyzed and nacre was used as a control.

Finally, a bicinchoninic acid (BCA) test has been performed to quantify the proteins in the 3 different dialyzed extracts. It uses a colorimetric method where BCA is used as the detection reagent for Cu^{1+} which is formed when Cu^{2+} is reduced by protein in an alkaline milieu. A purple-colored reaction product is formed by the chelation of two molecules of BCA with one Cu^{1+} . This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562nm that is linear with increasing protein concentration. Albumin standards are used for plotting the standard curve.

Lipids - The lipid content of the OrgonWL and OrgonE was analyzed by thin layer chromatography according to Rousseau *et al.* (2006). OrgonWL is an extract obtained after extraction of the powdered OrgonT with water using accelerated solvent extractor at 100°C (ASE200, Dionex). Analyses were performed on silica plates with heptane/diethylether/acetic acid (60,25,15, v/v/v) as mobile phase. Samples of 2µl of OrgonWL and 20µl of OrgonE of the lipid extracts in chloroform/methanol (2/1) were loaded on a silicate plate and the TLC was stopped when migration front almost arrived at the top of the plate. After drying, lipids were stained with copper nitrate reagent (10% w/v copper nitrate, 23% ethanol, 8% phosphoric acid, water) and heated in an oven at 105°C for 2h30. A standard lipid mixture was run in parallel for the qualitative determination.

RESULTS

Extraction yields and composition of the extracts

Three different protocols have been applied to obtain four samples (OrgonW, OrgonE, OrgonAS, OrgonAl) and the yield of each extract reported in Table 2. After each extraction, the samples were dialyzed in order to desalt and to concentrate the organic matter to obtain OrgonWd, OrgonEd, Orgon ASd and OrgonAId. All dialyzed and not dialyzed extracts are constituted by a mineral and an organic fraction. Rock-Eval analyses enabled to determine the contribution of the organic carbon in each fraction through the values of the total organic

carbon content (COT) and the mineral carbon associated with the carbonates (C_{MIN}) which reprecipitate during the extraction. By subtraction, we assume the amount of salt in each extract (Table 2).

Extract	Yield [ppm]	TOC	Organic*	CaCO ₃	Salt**
		[% of the extract]	[% of the extract]	[% of the extract]	[% of the extract]
OrgonW	110	2.2	5.5	32	62.5
OrgonWd	46	2.9	7.2	65	27.8
OrgonE	7730	0.4	1.0	2.4	96.6
OrgonEd	142	1.6	4.0	4.1	91.9
OrgonAS	73*10 ⁴	0.6	1.5	8	90.5
OrgonASd	6344	1	2.5	12.5	85
OrgonAI	16440	0.3	0.7	61	***
OrgonAId	1646	2.2	5.4	9.3	***

Table 2. Concentration in global organic matter, CaCO₃ and salt of dialyzed and not dialyzed samples. *The content of global organic matter is obtained by multiplying the TOC content by 2.5 **The salt percentage is obtained by subtraction of organic and CaCO₃ percentage. ***OrgonAI contains insoluble minerals.

We assumed that organic carbon represent 40% of the total organic matter (essentially C, H, O, N, S, *e.g.* for chitin). The latter is therefore obtained by multiplying the TOC value given by the Rock-Eval by 2.5. In the case of OrgonAI, residual insoluble minerals such as kaolinite were concentrated with the insoluble organic matter. Rock Eval analysis shows that OrgonE contains 1% of organic matter, 2.5% CaCO₃ and, by difference, 96.5% mineral salts, most probably CaCl₂. In table 2, it can be noticed a clear concentration of the organic matter after dialysis of the extracts. Nevertheless the dialyzed samples are not purely organic and are essentially made of salts except for OrgonWd in which calcium carbonate has also been concentrated. According to Rock-Eval results, OrgonWd turns out to have the highest organic content.

Samples	Na (%)	Ca (%)	Fe (%)	Mg (%)
NacreW	27,36	2,30	0,05	0,21
OrgonW	3,82	27,81	0,05	0,95
OrgonE	0,31	42,51	*	0,07
OrgonAS (>3KDa)	3,02	25,47	0,7	0,18
OrgonAI (>3Kda)	2,89	31,02	0,41	0,23

Table 3. Atomic absorption spectroscopy analyses of four extracts (OrgonW, OrgonE, OrgonAS, OrgonAI). NacreW is used as a positive control. *indicates that the measured value is below the detection limit of the apparatus.

Atomic absorption analysis have been used, with nacre as a control (extracted with Lopez *et al.* (2001) protocol) to determine the elemental composition of the freeze-dried extracts. We observed (Table 3) that samples still contain a high amount of calcium, while iron and magnesium are almost absent. Amounts of Na^+ in the order of 2 to 3% have been maintained in the extracts even after water and HCl treatments. Similar treatment (water) performed on NacreW showed that the amount of sodium ranged around 27 % in the extant representatives. X-Rays analyses show that OrgonAId contains kaolinite, quartz, possibly some traces of goethite ($\text{FeO}(\text{OH})$), very few potassic and plagioclase feldspars. OrgonWd still contains calcite and traces of gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). The two other samples, OrgonEd and OrgonASd, too hydrophilic, were analyzed by FTIR. Their hydrophilic behaviour comes from the CaCl_2 salts formed by reaction of Ca^{2+} ions dissolved out of the rock with HCl and surprisingly not eliminated with the dialysis. We used the attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-IR), a method enabling to carry out experiments even with hydrated, in particular hydrophilic samples, as no sample preparation is required. The results for OrgonASd are shown in figure 23.

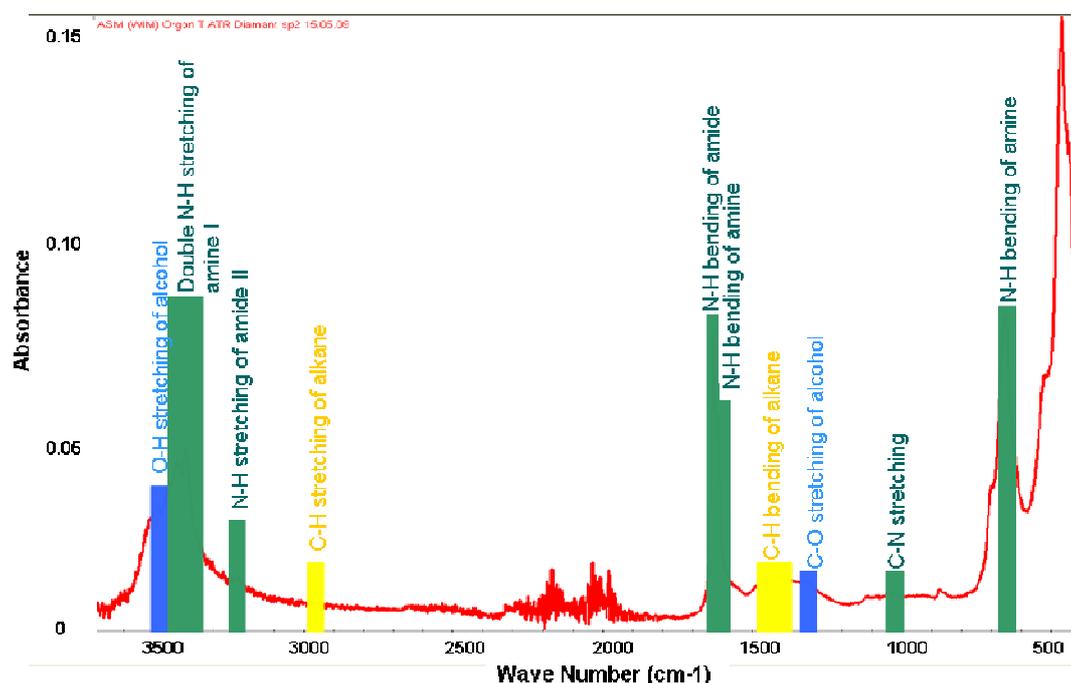


Figure 23. FTIR analysis of OrgonASd sample.

The spectrum of OrgonASd is the only one shown because the one obtained with OrgonEd is very similar except in the zone between 900 and 1400 cm^{-1} which contains denser peaks in the case of OrgonASd (figure 23). Peaks in the 1000-1300 cm^{-1} range testify to the presence of sugars (Dauphin, 2006). In both samples, we observe the presence of an amine I with the

typical double vibration peaks of N-H stretching (which indicate an amine I) at 3350-3450 cm^{-1} , the N-H bending of an amine I at 1550-1650 cm^{-1} and the N-H bending at 650 cm^{-1} . The C-N stretching peak is found at 1000-1050 cm^{-1} . An amide II has been also identified in OrgonASd and OrgonEd samples thanks to the typical single band of vibration at 3200-3250 cm^{-1} (which indicates a secondary amide), the N-H bending band at 1650 cm^{-1} and the C-N stretching at 1000-1050 cm^{-1} . The C-H stretching vibration peak at 2950-3000 cm^{-1} and the bending one at 1400-1500 cm^{-1} indicate the presence of an alkane as in OrgonEd. Finally the O-H and C-O stretching mode appear respectively at 3500 cm^{-1} and 1300-1350 cm^{-1} suggesting that the samples contain an alcohol. The ATR-IR analyses of OrgonWd, OrgonWad and OrgonAId (not illustrated) showed similar results except that for OrgonAId where kaolinite and traces of quartz hide almost all the spectrum. In conclusion, the samples contain amines I and amides II (that can indicate the presence of proteins), associated to some alkanes and alcohols.

Evidence of the presence of proteins in the extracts

To acknowledge the presence of preserved proteins in the extracts, high performance liquid chromatography analyses were carried out on the three dialyzed and soluble samples, *i.e.* OrgonWd, OrgonWad and OrgonEd. The results are shown figure 24.

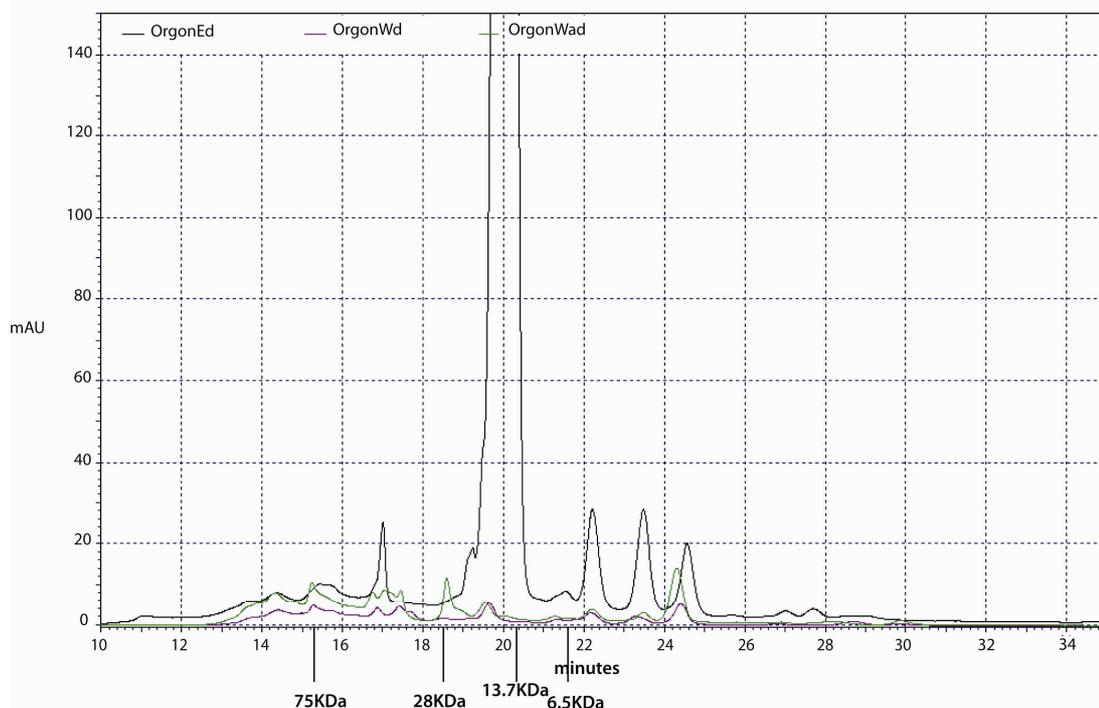


Figure 24. HPLC-gel filtration chromatograms of OrgonEd, OrgonWad and OrgonWd extracts obtained at 226nm. Standard mixture has been previously analyzed and the size is indicated below the chromatogram. mAU= Milli Absorbance Units.

These chromatograms were acquired at 226nm better than 280nm, the latter requiring higher quantities of material than at 226nm, because of its low sensitivity. Moreover, Marin *et al.* (2001) showed that shell proteins do not absorb at 280nm, only tryptophan, tyrosine and phenylalanine absorbing at this wavelength. We shall see in the next section that these three amino acids are almost absent from our samples. At 226nm, peptide bonds are recorded, but also a wide range of compounds including inorganic salts. OrgonEd seems to contain the largest quantity of proteins, followed by OrgonWad, then OrgonWd. But OrgonEd contains also a fair number of calcium chlorides. From 19min up to the end of chromatograms, the samples display the same profile, with a main peak at 19.6min and 3 other peaks at 22.3, 23.5 and 24.5min. In gel permeation, the larger retention times correspond to the smallest molecules. It can be supposed that these peaks correspond to small proteins with molecular weights below 6.5KDa according to the standard. The profiles observed from 0min until 19min are different in all samples: suggesting that the protein or inorganic salts nature and content may be different depending on the extracts. The largest molecules, here more than 80kDa in size, are probably not large proteins but rather glycoprotein complexes. The presence of sugars was confirmed by the presence of peaks in the range 1000-1300 cm^{-1} in ATR-IR (Figure 23) (Dauphin, 2006). Moreover, Dauphin and Denis (2000) having examined soluble organic matrices of bivalves and gastropods by HPLC evidenced that soluble organic molecules were not pure proteins and that the variety of profiles in HPLC was due to complex protein-sugar entities. In any case, molecules detected (at least partly proteinic) seem to be small given that their main relative peaks arise between around 20 and 6.5 kDa.

In order to confirm these results, amino-acid analyses have been performed on 3 dialyzed samples (OrgonWd, OrgonEd, OrgonWad) and one sample of nacre, used as a control (figure 25).

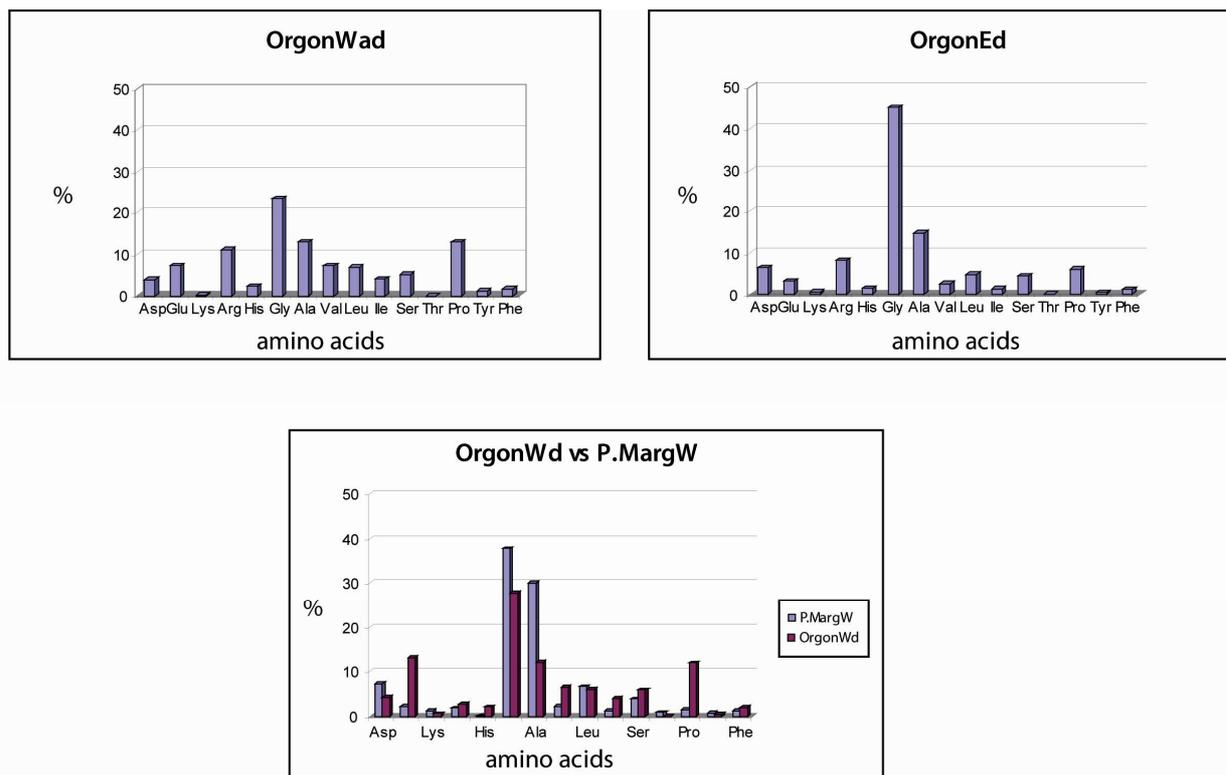


Figure 25. Amino-acid analyses of three Orgon extract samples. Nacre extract, extracted with water, was used as a control.

OrgonWad contains the greatest amount of amino acids, followed by OrgonWd and OrgonEd. When comparing the two HPLC techniques (gel-filtration chromatography for non-denatured molecules and reverse phase chromatography for hydrolyzed-amino acid analyses), we obtained the same abundance ranking in similar extracts, with the exception of OrgonEd, the ethanol-based extract, that showed the single disagreement. This extract showed the strongest response by gel-filtration HPLC whereas it is actually the third regarding its amino-acid content. Thus, we confirm that using the 226 nm wave-length for the detection of peptidic amino-acids is not selective enough. The main source of differences between the OrgonEd extract and the two other ones lie most probably in the different result of extraction under ethanol and water, respectively. Indeed, OrgonEd contains essentially lipids and inorganic salts; some of which are probably detected at 226nm. Moreover the ratio protein-sugar must also play a role in these artefacts. The amino acid contents of the water-based extracts are consistent with results obtained by HPLC.

Regarding the amino-acid distribution, Figure 25 shows that Orgon extracts display the typical features of biomineralization proteins (with differences related to diagenesis as described in the literature). Aliphatic amino-acids are most abundant with glycine and alanine being dominant, then valine, leucine and isoleucine. This order is also observed in the nacre control. Glycine is always the most abundant amino-acid: Weiner and Lowenstam (1980) had found the predominance of this amino acid in well-preserved fossils. Aromatic amino acids, tyrosine and phenylalanine, are almost absent in Orgon as well as in the nacre. Threonine is almost absent in Orgon as in the nacre while proline is well represented in Orgon contrary to the nacre. The diacid amino-acids are important for the nucleation and growth mechanisms of biocarbonates. Glutamic and aspartic acids are well represented in the carbonate fossils (Mitterer, 1968; Trichet, 1968; Mitterer and Cunningham, 1985; Trichet and Défarge, 1995) as observed, for example, in fossil ammonites (Dauphin, 2006). Here, depending on extraction protocol, glutamic acid may be significantly more abundant (*e.g.* OrgonWd vs OrgonEd). Finally, regarding the dibasic amino acids, histidine and lysine are poorly abundant whereas arginine is high, as in the nacre. Attention must be paid to the fact that shell layers are different between recent and fossil taxons since the aragonitic layer, *i.e.* that directly comparable to the internal nacreous layer in the shell of *Pinctada margaritifera*, had been dissolved in fossil rudists, as it has been in Orgon rudists samples.

Then, to determine if these amino-acids are free or linked, *i.e.* belonging to polypeptides, amino-acid analyses have been performed with and without hydrolysis according to Bada and Schroeder's method (1972). Results are shown in figure 26. It is clearly observed that, without hydrolysis, only few amino-acids were detected, proving that most amino-acids are linked together in polypeptidic entities.

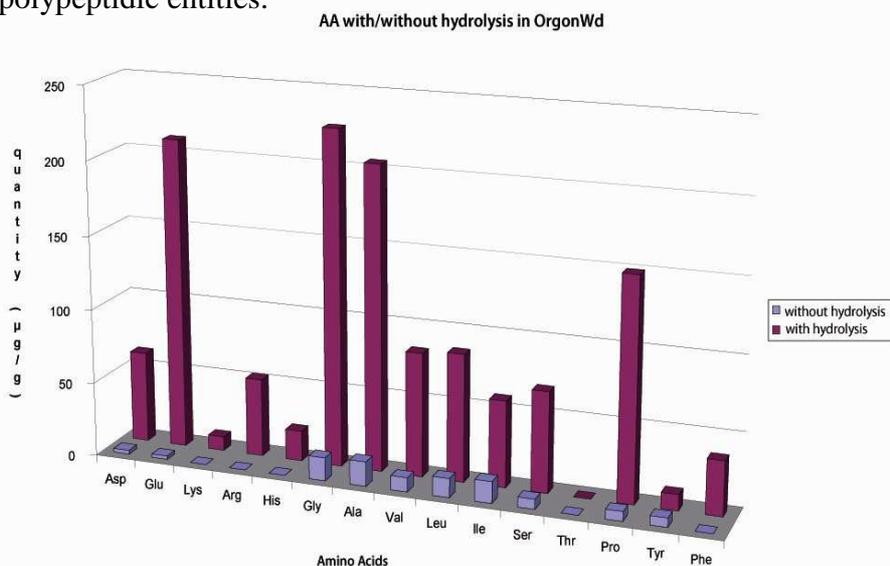


Figure 26. Amino-acid analyses of OrgonWd with (purple) or without (blue) the hydrolysis step.

Bicinchronic acid (BCA) test is a very sensitive and fast method to determine the amount of proteins in biological samples. Moreover this test does not interfere with detergent and other contaminants. Protein content of each dialyzed samples was quantified by BCA test. Results are shown in table 4.

Sample	[concentration] $\mu\text{g/ml}$	Std Dev
OrgonWad	53,9	0,007
OrgonWd	64,6	0,077
OrgonEd	10,7	0,003

Table 4. Protein contents of three dialyzed samples determined by BCA test. Std Dev= standard deviation

The BCA test is sensitive to the macromolecular structure of proteins, the number of peptide bonds and the presence of one of the four following amino acids: cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine. The results reported in Table 4 are consistent with those obtained with amino acids (figure 25), with the exception of OrgonWad which contains more amino acids than OrgonWd according to the amino-acid analysis and fewer proteins according to the BCA test. This can be tentatively interpreted by the fact that during the extraction of OrgonWad, the acid became highly concentrated under freeze-drying; this provoking the hydrolysis of proteins. Indeed the number of peptide bonds influences the BCA results. The protein content is low anyway in all extracts.

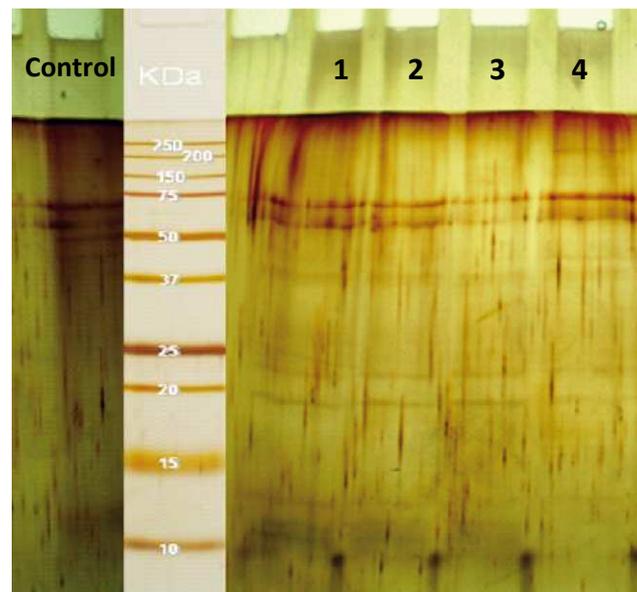


Figure 27. Compared electrophoresic gels (SDS-PAGE) of the control nacre *Pinctada margaritifera* vs OrgonWd (same extraction protocol). 1. OrgonWd at a concentration of 1.5mg of proteins/100 μl , 2. OrgonWd at 1.5mg of proteins/150 μl , 3. OrgonWd at 1.5mg of proteins/200 μl and 4. OrgonWd at 1.5mg of proteins/300 μl . OrgonWd exhibits proteins 12, 18, 20 and 35 kDa in size.

The extract, OrgonWd, obtained after water extraction and then dialysis of the water-extract - OrgonW- gave the most important concentration in proteins (Table 4). Moreover, figure 26 shows that amino-acids seem to be linked together in polypeptidic entities. In order to confirm the preservation state of proteins, a SDS-PAGE electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) was performed with different concentrations of the extract (increasing concentrations from right to left in Figure 27). SDS-PAGE electrophoresis of molluscan proteins usually did not show discrete bands but rather smears that have been attributed to the presence of glycoproteins (Weiner *et al.*, 1977; Marin *et al.*, 2001). Nacre, the control we have used in this work, shows indeed a dark smear (Figure 27). However, protein bands appear, in OrgonWd records, after staining of the gel with silver nitrate. Their proteinic nature is reinforced by the fact that bands are more and more contrasted when the sample is more and more concentrated (right to left). Comparison with the protein ladder allows the determination of the size of these proteins, namely at 12, 18, 20 and 35kDa. Regarding the double bands at 55 and 70kDa, they do not correspond to proteins; indeed they are visible on many SDS-PAGEs analyzing proteins from bivalves (Bédouet *et al.*, 2001 ; Mouries, 2003 ; Marin *et al.*, 2003 ; Marin *et al.*, 2007). These bands are characteristic of calcium carbonate as they appear even with pure calcium carbonate dissolved in water ($K_s = 5 \cdot 10^{-9}$ à 25°C). SDS PAGE electrophoresis provides therefore evidence that proteins are actually preserved in calcitic fossils. Their residual size is rather small as previously demonstrated in many different bivalve shells by Marin and Luquet (2004). Moreover, Bédouet *et al.* (2006) demonstrated that 60% of the water soluble organic matrix from *Pinctada margaritifera* is made of small molecules of molecular masses below 1 kDa.

Evidence of the presence of lipids in the extracts

A thin-layer chromatography (TLC) was performed on OrgonWL and OrgonE in order to check the eventual presence of lipids. The standard, made of a mixture of standards corresponding to different lipid families (squalene, wax ester, triglyceride, fatty acid, sterol), was loaded on 2 bands. Different classes of lipids were evidenced by TLC (Figure 28).

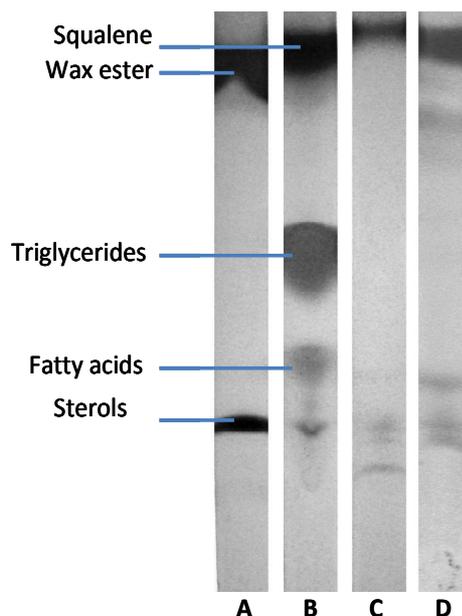


Figure 28. TLC analysis of lipids extracted from OrgonE (C) and OrgonWL (D). Line A and B: standard..

OrgonE is the extract obtained after mixing OrgonT with ethanol and a small quantity of HCl. This extract should contain a relatively larger quantity of lipids than in samples extracted with water. However, figure 28 shows that even with 20 μ l of the extract, OrgonE does not exhibit many discrete dark bands indicating the presence of a significant amount of lipids. This can be explained by the high amount of calcium chloride which represents 96% of the extract (Table 2). We suppose that the abundance of inorganic salts in solutes eluted by TLC has been shown to inhibit the loading of organic molecules. Sterols, fatty acids and squalene were identified in both extracts, with a significant amount of squalene in both samples. OrgonWL contains also wax esters. Other bands appear, in particular a band common to OrgonWL and OrgonE, very close to that evidencing sterols.

DISCUSSION

The extraction yields (Table 2) show that it is difficult to get rid of salts and/or carbonates and thus to concentrate quantitatively organic matter fractions out of the rudist shell. But the aim of this study was, essentially, to address the nature of the extracted molecules, in order to also address their eventual biological activity in medical and pharmaceutical applications.

The dialyzed extract obtained with water, OrgonWd, represents 46g/ton, including 3.3g/ton of organic molecules according to the extraction yield. The extraction yield is low, but analyses have shown that OrgonWd has provided the best preservation state of proteins (BCA test, Table 4 and SDS-PAGE, figure 27). To extract the intracrystalline organic fraction, we used a decarbonation process on OrgonW, followed by a dialysis to obtain OrgonWad. There was an increase in amino acid concentration (results not shown) but a decrease of proteins content due to an acidic hydrolysis in presence of HCl 2N. HCl 2N was chosen as decarbonation reagent and not acetic acid which forms acetates with calcium carbonate or EDTA, which is difficult to eliminate in subsequent reactions and in biological tests.

We have used an alcoholic extraction to recover lipids. OrgonEd extraction yielded 140g/ton. Our goal was not to optimize the performance quantitatively, but the nature of molecular entities and their biocompatibility with human tissues or cell cultures. Lipids may participate in calcification (Ingalls *et al.*, 2003). But much less is known about their composition in biomineralized minerals and their role in biomineralization compared to those of amino acids (Ingalls *et al.*, 2003). Moreover it has been proved that lipids can be preserved over time in the shell matrix of different fossil bivalves (CoBabe and Pratt, 1995). Rousseau *et al.* (2006) were the first to evidence presence of lipids in nacre. Their results showed 80% of squalene like lipids, along with few cholesterol, fatty acids and triglycerides. Squalene is a key molecule in the synthesis of cholesterol, steroid hormones, and vitamin D in the human body. Beneficial effects of squalene and lipids in living organisms have already been proven (Kelly, 1999; Lefur and Arnaud, 2004). Here, we show that OrgonE and OrgonWL contain lipids, essentially squalene. Fatty acids and sterols were identified. The high amount of squalene and the classes of other lipids displayed show similarities with the features of lipidic constituents identified in fresh nacre of *Pinctada margaritifera* (Rousseau *et al.*, 2006).

To establish the degree of degradation having occurred in the proteic spectrum of the rudist shells during diagenesis, samples were compared to their extant representatives. Indeed, a commonly accepted criterion for recognizing the least diagenetically altered fossils is the similarity in qualitative and quantitative composition of their organic constituents with that of the living representatives of the same taxonomic group (Curtis and Krinsley, 1965 ;Matter *et al.*, 1969). Here almost no aromatic amino acids were identified, neither in our samples nor in *Pinctada maxima* (Pereira-Mouries, 2003) and *Nautilus* (Dauphin, 2006). In OrgonWd, glycine is the most important amino acid followed by alanine: Mouries (2003) demonstrated that *Pinctada maxima* contains more than 65% of glycine and alanine. However, a difference

in composition is highlighting as proline and glutamic acid are almost absent in *Pinctada maxima* (Figure 25). The other amino-acids are comparatively in the same range of quantity (Pereira-Mouries, 2003). Thus polypeptides supposedly lost their secondary structure but seem to be quite well-preserved.

Decontamination process usually used (Griffin *et al.*, 2009) were not applied in this study because peptidic contents would have been easily hydrolyzed. Our approach was different: in another study (Dissaux *et al.*, in prep, a), it was proven that the residual organic matrix of our samples was produced by biomineralization of rudist's shells with no contamination. Diagenesis caused a degradation of the proteic entities, as demonstrated by many authors (Matter *et al.*, 1969; Weiner and Lowenstam, 1980). However, it has long been known that amino-acids might exhibit a higher degree of stabilization when associated with minerals (Grégoire, 1966; Ingalls *et al.*, 2003). Here we show that these polypeptides can be preserved in a quarry limestone and are not identified only in exceptionally well-preserved fossils.

The question that arises next is the estimation of the reserves of these organic entities within the quarry. Orgon quarry still contains about 30 Gtons of limestone. Orgon limestone contains 500g to 750g/ton of organic molecules depending on the levels analyzed in the quarry. In the concentrated shell samples we measured up to 1500g/ton. With the water extraction-dialysis process (3.3g/ton of organic molecules, assimilated to proteins), reserves can therefore be estimated at ca 100 tons of extractable molecules. With the alcoholic-dialysis process (77g/ton of organic molecules assimilated above all to lipids), the reserves would correspond to about 2,300 tonnes of extractable lipidic molecules in the whole quarry. To test whether the latter process of recovery of organic molecules is applicable at industrial scales, it has been conducted in a semi industrial pilot. The yield fell to 63% of that of the laboratory, lipidic reserves amounting to ca 1450 tonnes. In another paper we proved that these bioconstructed limestones can be considered as sustainable sources of molecules with pharmaceutical interest (Dissaux *et al.*, in prep, b, c).

CONCLUSION

Amino acid, peptidic and lipidic fossil molecules, even subjected to a mild diagenesis (Dissaux *et al.*, in prep) underwent some degradations. We already proved that, the proteic content is reduced compared with that of extant organic matrix (*i.e.* 8% of the initial shell

content, Dissaux *et al.*, in prep, a). However, Orgon quarry still contains polypeptides of size lower than 35KDa.

Mass extraction of organic molecules with pharmaceutical interest is possible in a quarry like Orgon. Two protocols have been developed, using respectively water and ethanol. Their yield is low but with current Orgon reserves, it is possible to extract at least 100 tons of proteins. The lipid extraction was also performed in the laboratory and in a semi-industrial pilot. With the latter extraction process, lipids represent a stock of 1450 tonnes of extractable molecules.

CHAPITRE V:
Activité topique du calcium sur explants de
peau humaine régulée par des molécules
fossiles

V.1.. Résumé de la publication 3: Activité topique du calcium régulée par l'extrait OrgonE sur peau humaine maintenue en survie

Dans cet article nous voulons démontrer que les molécules organiques fossiles sont toujours bioactives et qu'elles sont capables de réguler l'action du calcium sur la peau. Des tests sur peau humaine maintenue en survie ont donc été réalisés en collaboration avec le laboratoire Bio-EC de Longjumeau. Les peaux proviennent de plasties abdominales de femmes. Elles sont maintenues en survie dans un milieu BEM (Bio-EC Medium) pendant une dizaine de jours. L'activité sur la peau est analysée après application topique de l'extrait à tester, tous les deux jours. Deux types de tests sont ensuite réalisés : d'une part, une analyse de la morphologie des couches (épiderme et derme) de la peau par coloration au trichrome de Masson après 10 jours. D'autre part, l'activité des cellules sera observée par coloration des glucosaminoglycanes (GAGs) neutres et acides au bleu alcian-P.A.S et par immunoloration en ce qui concerne les autres activités. L'extrait testé dans cet article est l'extrait OrgonE ; comme il a été démontré dans l'article précédent, cet extrait est composé essentiellement de lipides et de chlorure de calcium mais également d'une faible quantité de petites protéines. Son activité sera comparée à un témoin positif, l'extrait NacreE obtenu avec le même protocole mais à partir de la nacre de *Pinctada Magaritifera*, et à un témoin négatif, BlanE extrait à partir de carbonate de calcium précipité.

La morphologie a été observée à 9-10 jours. L'extrait organo-minéral obtenu à partir de la roche d'Orgon stimule de façon régulée la prolifération des kératinocytes et accélère la différenciation épidermique terminale : ceci peut être observé par l'apparition d'une épaisse couche de kératinocytes en phase terminale de différenciation sous le *stratum corneum* (Figure 29). De plus, l'extrait OrgonE préserve une parfaite morphologie épidermique. Il y a une nette accélération du renouvellement de l'épiderme comparé au témoin. Les témoins positif et négatif provoquent quant à eux de nombreuses dérégulations ; mais on peut distinguer que certains effets, tels que la prolifération des kératinocytes, sont dus aux chlorures de calcium. Ces sels sont également très actifs pour stimuler la production de collagène IV, collagène qui permet de restructurer la jonction dermo-épidermique (Figure 30). De plus, le complexe organo-minéral aussi bien que le témoin négatif, activent les fibroblastes qui produisent du collagène de type III et I (Figure 31 et 32). Ces fibroblastes vont également produire des

glycosaminoglycanes (GAGs) neutres, réservoirs de croissance des lames basales, sous l'effet des trois extraits testés. Cependant, l'extrait organo-minéral OrgonE est le seul extrait qui stimule la production de GAGs acides par les fibroblastes. Dans cette étude, les sels de calcium n'expliquent pas la production de ces GAGs acides (Figure 33). De plus, la durée de vie d'un glycosaminoglycane étant d'environ 24H (Laurent and Fraser, 1992), la production des GAGs acides observée après 9 jours a bien été stimulée par la fraction non minérale de l'extrait OrgonE. Ce résultat est important : les GAGs acides sont constitués pour une bonne part par l'acide hyaluronique qui permet une bonne régulation de l'hydratation du derme en plus de la restructuration de la jonction et du raffermisssement du derme papillaire (Laurent and Fraser, 1992). De plus, cette molécule disparaît progressivement avec l'âge (Meyer *et al.*, 1934).

En conclusion, cet article démontre une très bonne conservation de l'activité biologique de ces molécules fossiles d'origine biogène. Les molécules fossiles ont même montré certains potentiels d'activité originaux liés probablement à l'histoire diagénétique comme par exemple la stimulation de l'expression d'acide hyaluronique du derme. Ce travail met en évidence une très bonne activité biologique cutanée des molécules de biominéralisation, témoignant de sources d'actifs potentiels obtenus par simple extraction des biocalcaires.

V.2. Publication 3: Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules

Aurore Dissaux¹, Xavier Bourrat¹, Evelyne Lopez², Elian Lati³, Philippe Gasser³

¹ ISTO, Université d'Orléans/CNRS/Université François Rabelais-Tours (UMR 6113), Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 45072 Orléans cedex, France.

² Muséum national d'Histoire Naturelle, BOREA (CNRS/MNHN UMR 7208), 43 rue Cuvier, 75231 cedex 05 Paris, France.

³ Bio-EC, 1 chemin de Saulxier, 91165 Longjumeau cedex, France.

Corresponding authors: Aurore Dissaux, adissau@gmail.com; Xavier Bourrat, Xavier.Bourrat@univ-orleans.fr

ABSTRACT

Biological processes related to the formation of mineralized tissues implicate some organic molecules regulating the calcium. This is the case of bone or teeth, but so is the biogenic calcium carbonate in nature. Here we show that these limestones represent a potential source of active molecules for the skin, little explored until now. We experimented molecules extracted from a biogenic limestone located in Orgon (France) using an alcohol-based extraction directly on the grinded rock. The study has been conducted on human skin explants maintained in survival for ten days. To highlight their activity, we compared it with pure calcium carbonate as negative control and a nacre extract as positive one. The extract from Orgon stimulated the proliferation of keratinocytes while maintaining a perfect physiological morphology. It activated also fibroblasts in the dermis with the overexpression of collagen types I and III and glycosaminoglycans, including hyaluronic acid. As a result, a restructuring effect of the dermo-epidermal junction was noticed after 9/10 days. We concluded on a very good preservation of the biological activity of these fossil molecules owing to their outstanding activity on skin physiology. The biogenic limestones represent a source of actives by simple extraction of rocks.

Keywords: biomineralization, nacre, calcium, chloride, laminin-5, Ki67, LEKTI, collagen, hyaluronic acid, GAGs, retinoic acid, keratinocyte, fibroblast

INTRODUCTION

Calcium is paradoxically very little used for its active properties in dermocosmetology even if it is shown that its role is essential in the different layers of the skin (Fuchs, 1990, Elias *et al.*, 2002). The reason is probably that we know very few things about its regulation. However, competent molecules capable of regulating its action exist in the processes of biomineralization of calcium. It is for example the case of nacre where these molecules are trapped in the structure during its formation (Rousseau *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2008).

In this work we show that calcium, when combined with organic molecules extracted from Orgon limestone, can be a source of actives in regenerating and moisturizing the skin. We will show, in the first part, the histological results to assess their activity on skin morphology after 9/10 days of topical application. In a second part we will present the mechanisms of action of these different stimulations on the epidermis by immunostaining. Finally, in the third part we will prove in the dermis that the activity covers its densification as well as the restructuring of the dermo-epidermal junction (DEJ) supported by the stimulation of collagen, glycosaminoglycans and laminin-5 with immunostaining or staining.

MATERIALS AND METHODS

The limestone was supplied by Omya Orgon (Bouches du Rhone, France). The deposit is dating from the Barremian (Cretaceous, about 120 million years). This deposit of high purity (¹⁰) is used as a source of calcium carbonate for numerous pharmaceutical indications (about 4000 tons / year).

The extract of Orgon limestone was obtained after stirring for 24 hours, 100g of powder (particle size, less than 100µm) mixed with 500ml of absolute ethanol and 1ml of hydrochloric acid at 37% (Bourrat *et al.*, 2008). The mixture was then centrifuged and the supernatant filtered to 45µm. Finally, the filtrate was evaporated using a rotary evaporator and

¹⁰ Dissaux A., Bourrat X, Gabant G, Cadene M, Gautret P, Lopez E, Trichet J, "Limestones, a source of proteins and lipids"

the extract was lyophilized and named OrgonE. A negative control was performed with the same protocol, starting with a commercial precipitated calcium carbonate (VWR). It was called: BlanE. It is purely mineral. A positive control was produced by extracting mother-of-pearl with the same protocol and named NacrE. Mother-of-pearl was obtained from the shell of *Pinctada margaritifera* (particle size less than 100µm).

Protocol conducted on human skin explants maintained in survival.

Preparation of explants:

27 explants with a diameter of about 10mm were obtained from an abdominoplasty. The explants were divided into 3 groups of 6 explants for testing the 3 extracts. An additional set of 6 explants has served as 'untreated control' and another set of 3 has served to control skin quality at day 0 (D0). The explants were kept in survival in BEM culture medium (BIO-EC's Explants Medium) at 37°C in a humid, 5 % CO₂ atmosphere.

Treatment:

Each extract material was incorporated at a concentration of 1% in a gel of 2% CMC (sodium carboxymethylcellulose) for this work. Topical application was made at a rate of 2mg per explant. The untreated control was treated with CMC alone. The treatment was repeated every two days.

Samples for histology: At D5 and D9 (or D10), three explants from each batch were taken and cut into two, one half was fixed in buffered formaldehyde for observing the morphology and the other half was frozen at -80 °C. After 24 hours of fixation in buffered formaldehyde, samples were dehydrated in graded alcohol, impregnated and embedded in paraffin. Sections of 5 microns were made and mounted on slides.

Examination of morphology: The observations were performed on paraffin sections after staining with Masson's trichrome, a Goldner variant. Microscopic examination was conducted to assess the general morphology of the dermal and epidermal structures.

Observation of the activity of keratinocytes and fibroblasts.

In a second step, the activity of keratinocytes (Ki-67 and LEKTI) was assessed and marked at D5 while the activity of fibroblasts (glycosaminoglycans (GAGs), collagen and laminin-5) was characterized after 9 or 10 days of topical application (D9 or D10).

Immunostaining of Ki-67: The stimulations have been highlighted by immunostaining with antibodies directed against the marked element.

GAGs staining: The neutral and acidic GAGs were examined on paraffin sections after staining with alcian blue-PAS (Mowry staining).

Immunostaining of collagen I, III, IV and laminin-5: collagens and laminin-5 were stained on frozen sections with polyclonal anti-collagen I, III and IV and a monoclonal anti-laminin-5 by means of a biotin/streptavidin amplifier and nuclei post stained with propidium iodide for collagen I, IV and laminin-5 and Masson's hemalum for collagen III.

2. RESULTS

2.1 Treatment protocol and skin morphology after 9 or 10 days.

The rock extract (OrgonE) and the two control extracts, *ie* the positive one extracted from the nacre of *Pinctada margaritifera* (NacrE) and the negative one extracted from the chemically precipitated calcium carbonate (BlanE), were obtained following the same protocol. These three extracts were tested by topical application on series of human skin explants maintained in survival. After 9 (or 10) days, histological sections were prepared and stained with Masson's trichrome. The morphology of skin explants was examined by comparison to the control explant, T, treated with vehicle only (Figure 29).

With OrgonE, histological sections showed a good morphology characterized by a marked increase in the thickness of the *stratum corneum* (Figure 29b). There is also a thick layer of keratinocytes at the terminal stage of differentiation. This layer is usually reduced. It is not the

image of a disorder but results from the stimulation of cell renewal and terminal differentiation unfinished yet. The skin is not completely renewed, keratinocytes need to lose their nuclei to become corneocytes and thus constitute the *stratum corneum*. However, the renewal of the skin is clearly accelerated, compared to the control, since this is observed after 10 days of topical application. There is a very strong stimulation with regulation of all processes: this is evidenced by the thickness of the epidermis, which retains a good morphology with 6-7 cell layers, and no disruption in cell physiology. The control explant T (Figure 29a) presents a thick *stratum corneum*, moderately laminated, and moderately keratinized at the surface and at its base, with a slight parakeratosis. The epidermis has 4/5 cell layers with fairly good shape. Spongiosis appears moderate at the basal layer. This is not the case with OrgonE.

A comparison between OrgonE and BlanE allows distinguishing the effect related to calcium alone from that of the organo-mineral mixture. The pure mineral extract of calcium chloride reveals (Figure 29c) clearly acanthotic epidermis with 7/8 layers of cells. However, the morphology is moderately impaired: epidermis deregulations are characterized by a slight parakeratosis at the base of the *stratum corneum*. Moreover, these alterations are characterized by the presence of numerous cells slightly oedematous in the spinous epidermal layers. A spongiosis is very clear at the basal layer. On the contrary, the structure of the dermo-epidermal junction is sharp and the papillary dermis exhibits collagen with fibres forming a fairly thick dense network. Calcium causes the stimulation of certain processes, but they do not seem well controlled.

Regarding the positive control, i.e. the organo-mineral complex extracted from nacre, histological examination showed the same disturbances in the epidermis as with the pure calcium (BlanE), but more pronounced. This is certainly an effect of overdose in concentrations, probably too high, and more focused on some mechanisms only.

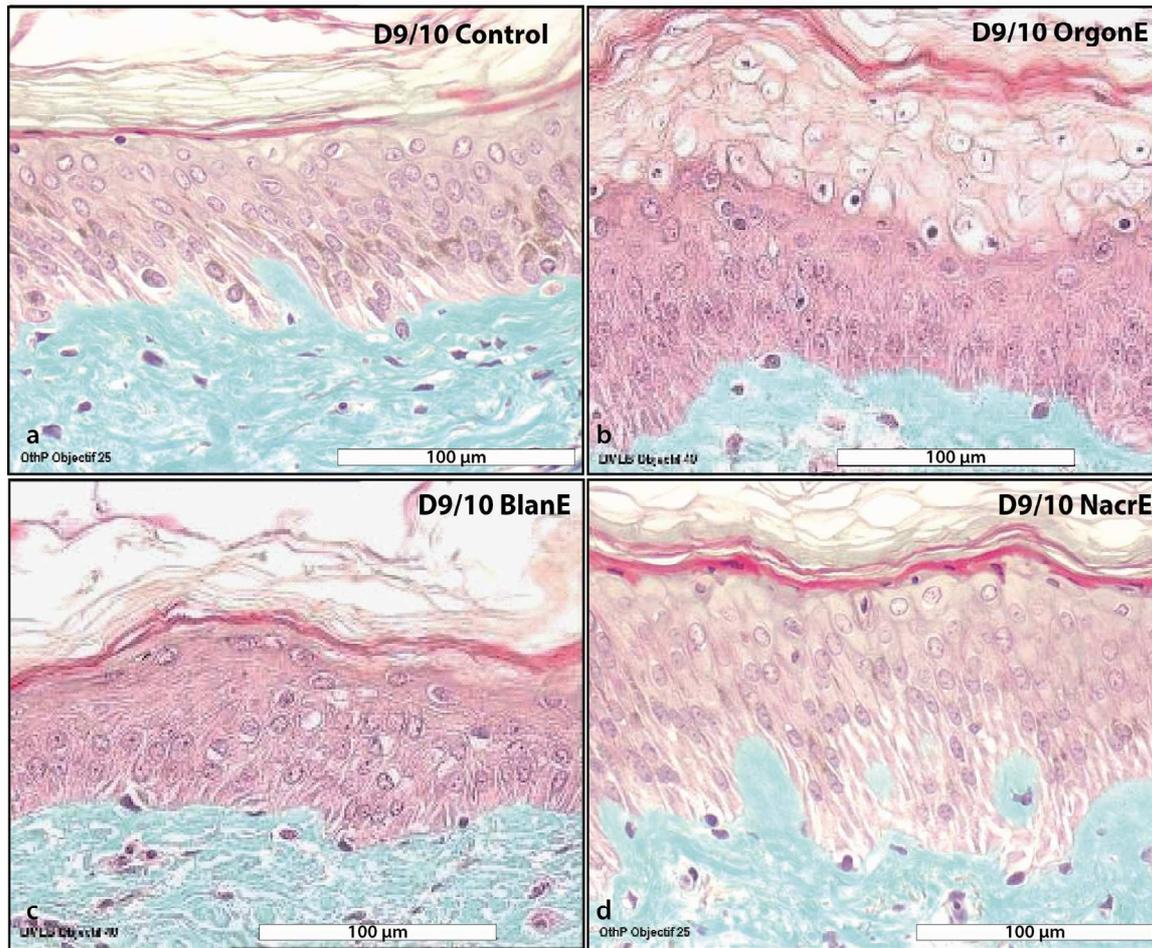


Figure 29. Morphology of explants after 9-10 days.

- a: Morphology of the untreated skin explant (control)
 b: Explant treated with Orgon E: important cell renewal with good morphology of the living epidermis and a thick layer of keratinocytes at the terminal stage of differentiation
 c: Explant treated with BlanE: several disorders appear
 d: Explant treated with NacrE: acanthosis with certain physiological disorders

2.2 Turnover of the epidermis and immunostaining

To see if the renewal of the skin occurs without disruption, the activity of keratinocytes was characterized by various immunostainings. The Ki-67 positive cells were counted in the epidermis at 5 days. The Ki-67 antigen is a marker of proliferation present in the nucleus of proliferating cells in G1, S, G2 and M. Its specific function is not known although its expression is necessary for the progression of cells proliferative phase (Scholzen and Gerdes, 2000). The Ki-67 antigen is detected by the antibody Ki-67. The mineral fraction - BlanE - shows an overexpression of the proliferation marker Ki-67. This indicates that the cells are still at the peak of mitosis at 5 days. The calcium, or more exactly the calcium chloride used

in this work has stimulated proliferation. This is not the case of calcium carbonate which showed a tendency to decrease with the same test (¹¹). With OrgonE, the number of Ki-67 positive cells is lower compared to that of the control (not shown), i.e. after five days, the peak of mitosis is supposed to be exceeded. The morphology witnesses the significant proliferation which probably occurred in the first 2-3 days.

Given the substantial production of corneocytes, the expression of serine protease inhibitor LEKTI should be strongly expressed in the granular layer of the epidermis (Mägert *et al.*, 1999). The LEKTI are the lympho epithelial Kazal-type inhibitors belonging to the family of Kazal type inhibitors. This test is justified in order to verify that the strong dissociation of corneocytes observed will not result in disruption of epidermal homeostasis. In fact, the absence of LEKTI would cause the increase in proteolytic activity of epidermal proteases: SCTE and SCCE. The hyperactivity of these enzymes causes a defect in the adhesion of the *stratum corneum* to the underlying epithelium. The loss of this barrier would then involve severe dehydration and facilitate the penetration of pathogens and allergens in patients. The production of LEKTI was seen to be apparently under the control of calcium. Indeed with OrgonE, the immunostaining of LEKTI compared to the control, is moderate, regular, slightly cytoplasmic or in the membrane on 1 to 2 layers of cells in the granular layer at the basis of the *stratum corneum*; it is slightly over-stimulated with calcium chloride (not illustrated).

2.3 Immunostaining of the dermis elements

Morphological examination of the papillary dermis in the explants treated with OrgonE during 9 / 10 days showed a significant restructuring effect of the relief of the dermo-epidermal junction (DEJ). The papillary dermis contained collagen fibres rather thick and filamentous under the form of a dense network. And it was well cellularized. Staining have been made to characterize the origin of the stimulation produced by the organo-mineral complex.

¹¹ Dissaux A., Bourrat X, Lopez E., Lati E., Gasser P., “*Mediation of calcium by fossil molecules on dermis and dermal-epidermal junction of human skin*”.

Tests for collagen IV immunostaining were performed. The mineral fraction alone (BlanE) markedly stimulated the production of collagen IV after 9 / 10 days of topical application (Figure 30c). The explant exhibited a net staining along the DEJ and in the papillary dermis. It was also clear around the annexes. There was no significant overexpression when the explants were treated with OrgonE or NacrE, in the dermis or along the DEJ.

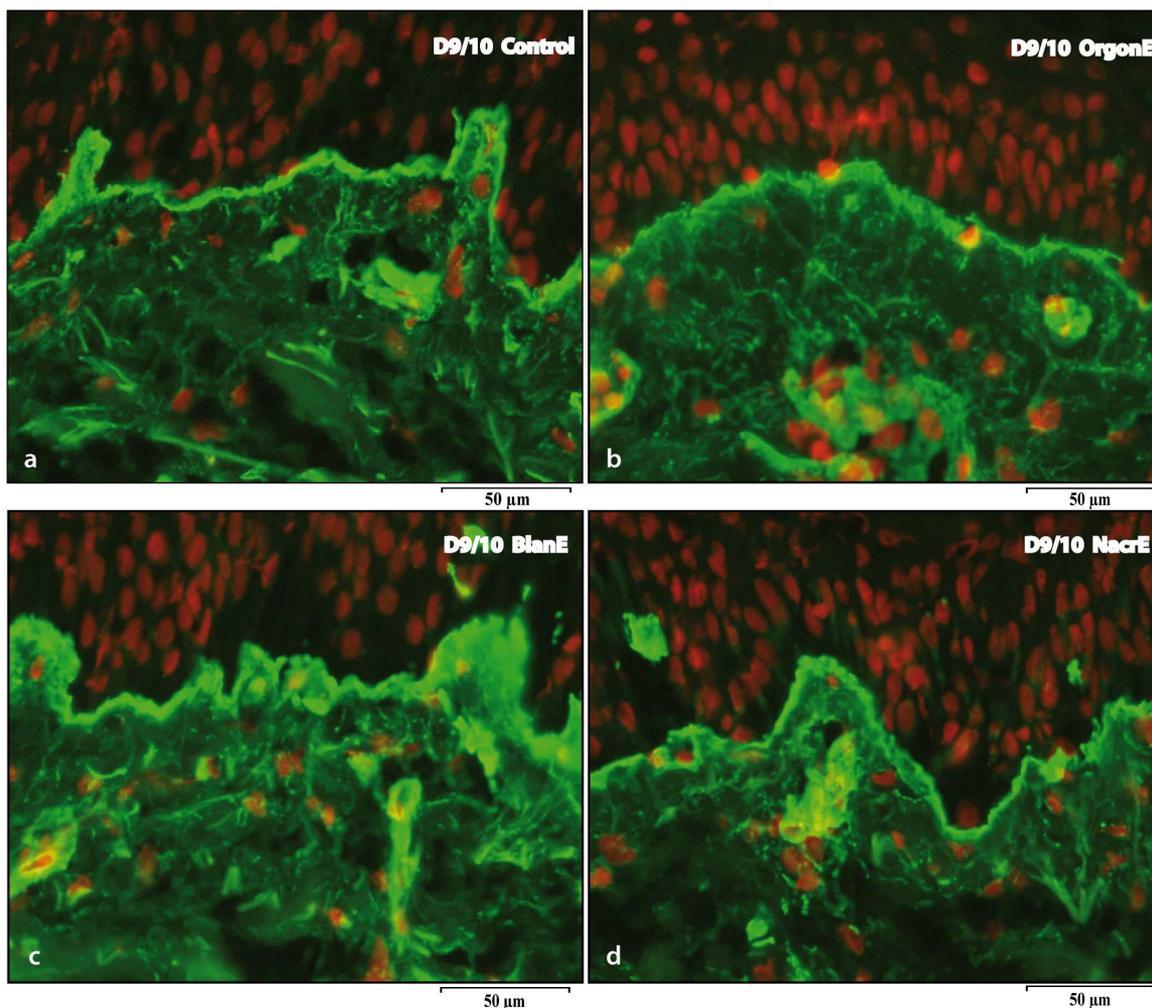


Figure 30. Immunostaining of collagen IV at 9 / 10 days
a: Staining of collagen IV on the untreated explant (control)
b: Explant treated with OrgonE: the staining remains unchanged compared to the control (a)
c: Explant treated with BlanE, the mineral fraction: overexpression at the DEJ and the annexes
d: Explant treated with NacrE: staining remains unchanged.

OrgonE and BlanE are two extracts which stimulate the production of collagen III: staining carried out after 9 / 10 days of treatment were moderate and fairly uniform throughout the

papillary dermis. This is also the case with NacrE. Collagen III was expressed as thin filaments with OrgonE whereas it was more diffuse in the control or with NacrE (Figure 31).

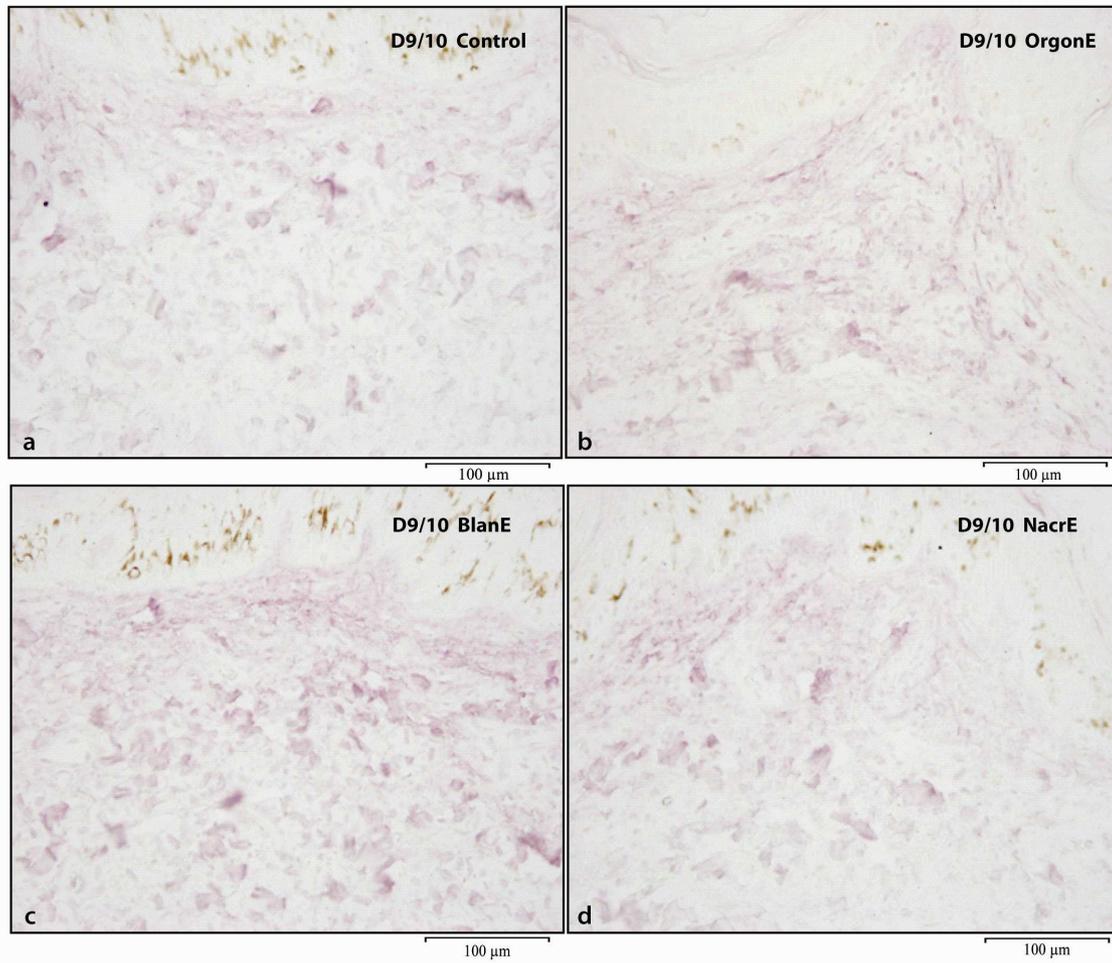


Figure 31. Immunolabelling of collagen III at 9/10 days.

a: Untreated explant (control).

b: Explant treated with OrgonE: collagen III expression evenly throughout the dermis.

c: Explant treated with BlanE: collagen III expression evenly throughout the dermis.

d: Explant treated with NacrE: staining is unchanged compared to the control.

The ratio of collagen I / III is important, thus we also analyzed collagen I. Stimulation with OrgonE and BlanE were equivalent: the staining was clear, fairly homogeneous and dense with thicker fibres than those seen on the control. This was evident throughout the papillary dermis (Figure 32). With NacrE, the explant also showed a staining of collagen I a little overexpressed: there were rather thick fibres throughout the papillary dermis.

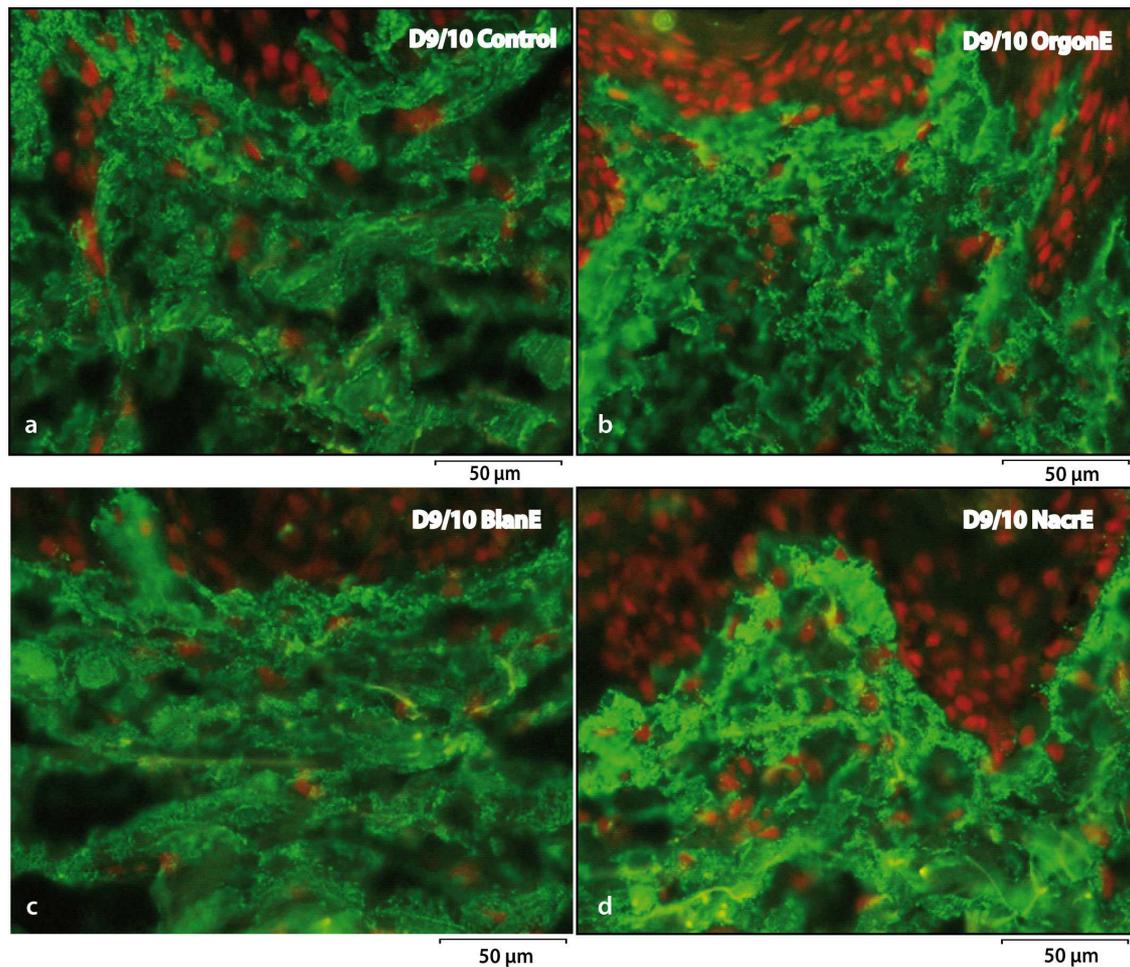


Figure 32. Immunostaining of collagen I at 9/10 days.

a: Untreated explant (control).

b: Explant treated with OrgonE: the expression of collagen I is moderately high compared to the control.

c: Explant treated with BlanE: there is only a slightly higher expression of collagen I compared to the control

d: Explant treated with NacrE: stimulation of the expression of collagen I.

The expression of glycosaminoglycans (GAGs) was then characterized. They form two families: the neutral GAGs constitute a reserve of growth factors at the DEJ, stimulate the mobility of fibroblasts and promote contacts between the extracellular matrix components while acidic GAGs are mainly composed of hyaluronic acid. The latter controls the moisturizing of the skin.

The neutral and acidic GAGs were observed after staining with alcian blue-PAS. After nine days of topical application of OrgonE, the explant showed that the neutral GAGs were fairly

net, forming a pink-purple band which was regular and thick along the DEJ. Acidic GAGs were significantly overexpressed in the papillary dermis compared with the untreated control. They were associated with neoformed thin fibres (Figure 33b). This acidic GAGs stimulation was observed neither with BlanE nor with NacrE. Only ancestral molecules from Orgon possess the actives that stimulated markedly the production of hyaluronic acid in the papillary dermis.

Regarding the production of neutral GAGs, stimulation was somewhat greater with the mineral fraction BlanE than with OrgonE or NacrE. In histological examination, neutral GAGs can be seen as a pink-purple strip along the DEJ. They are also denser in the papillary dermis (Figure 33c).

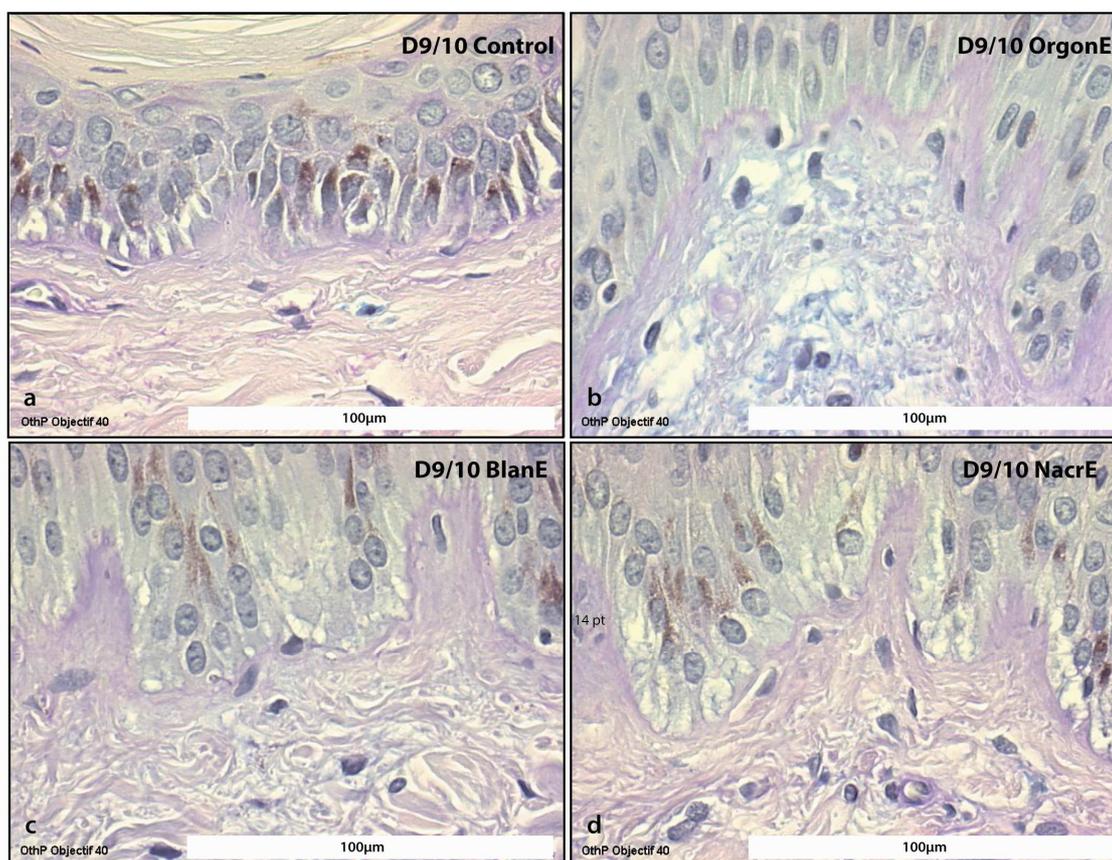


Figure 33. Blue-alcian P.A.S. coloration of GAGs at 9/10 days.

a: Untreated explant (control)

b: Explant treated with OrgonE: neutral GAGs formed a pink / purple strip along the DEJ, while acidic GAGs are significantly overexpressed in blue throughout the papillary dermis, associated with thin fibers (hyaluronic acid).

c: Explant treated with BlanE: clear overexpression of neutral GAGs (pink) and absence of acidic GAGs.

d: Explant treated with NacrE: low overexpression of neutral GAGs (pink) and absence of acidic GAGs.

The pure mineral fraction - BlanE - has also proved highly active in stimulating the production of laminin-5. This major adhesion protein allows the DEJ to bond to the dermis and to the epidermis in order to sustain the various mechanical stresses (Rousselle *et al.*, 1997). It is deficient in healing process and aging. The explants treated with the calcium salt - BlanE - have shown strong and regular staining of this protein as a fairly thick scalloped band along the DEJ, which is not observed with the control (not shown).

DISCUSSION

The extract of Orgon limestone was tested on human skin maintained in survival (*ex vivo*) for 9/10 days and showed multiple activities, well regulated, at several levels. The chemical composition of OrgonE was studied in a companion paper: it is an organo-mineral complex containing mainly calcium chloride, lipids and small proteins (¹²). The fossil molecules extracted with calcium were involved in the growth of calcium carbonate biocrystals and trapped in the limestone; this is the case of lipids (Cobabe, 1995). This extract showed a multiple activity on the turnover of the epidermis, on the restructuring of the dermo-epidermal junction and on the dermis itself.

In the epidermis, the action can be summarized by a complete stimulation of the turnover of the epidermal stratification. A cell proliferation occurred first, that was stimulated by the organo-mineral extract, but also with the calcium salts alone. The proliferation is supposedly stimulated by the mineral fraction. With Orgon extract, after five days, the keratinocytes have exceeded the peak of mitosis and cells are in G2 or G3. The terminal differentiation was initiated with Orgon but not with calcium alone. This terminal differentiation was clearly visible through the appearance of a substantial layer between the epidermis and the *stratum corneum*; the keratinocytes are in the final stage of differentiation. The layers of cells which were present at day 0, have been completely replaced and are, at day 9, at the last stages of terminal differentiation. The epidermis maintained a physiological morphology with 6/7 layers of cells. This was not the case with the calcium which showed an acanthotic skin but with several alterations. Similar deregulations were observed with the positive control, i.e. the

¹² Dissaux A., Bourrat X, Gabant G, Cadene M, Gautret P, Lopez E, Trichet J, "Limestones, a source of proteins and lipids"

nacre extract. The 'maturation' of the molecules over geological time, seems to be a beneficial factor for the complementary activity of these molecules.

Similar effects have been demonstrated with retinol. Indeed, retinoids are conventionally used for the treatment of many skin diseases such as acne, for example (Jones *et al.*, 1980). Although the clinical effects are very convincing, the mechanisms involved remain poorly explained. The effects of retinoids on the epidermis are also much better known than those on the dermis (Fisher and Voorhees, 1996). Many studies have shown that retinoids promote proliferation and desquamation of epidermal cells (Eichner, 1986; Fisher and Voorhees, 1996). They also play a fundamental role in the maintenance of epidermal differentiation (Virtanen *et al.*, 2000). But, retinoids cause hyperplasia of the epidermis due to hyperproliferation of keratinocytes (Rosenthal *et al.*, 1992). They also cause acanthosis and a decrease in the thickness of the *stratum corneum* (Elias, 1986). Retinol also causes a decrease in transepidermal water loss and a weakening of the skin barrier (Fisher and Voorhees, 1996; Fluhr *et al.*, 1999). Our results at this stage appear to show progress in this direction. In summary, the extraction process we used was developed to extract an organo-mineral active (Orgon), with an organic lipidic fraction. The mineral fraction is mainly composed of calcium chloride and to a lesser extent of calcium carbonate; it appeared as an important factor within the organo-mineral actives of Orgon but did not allow reconstructing a "new skin", alone. Organic molecules, competent for mineralization, are therefore essential to stimulate in a physiological manner the epidermis turnover. Finally, the fossil molecules, present in Orgon, have appeared to be more active than those extracted from the nacre. This may be related to an effect of hydrolysis, *e.g.* the supply of amino acids or small proteins that penetrate better into the different layers of the skin than bigger proteins of nacre.

The Orgon extract had also shown different stimulations in the dermis and the basal lamina. The dermis is a connective tissue made mainly of collagen and elastin fibres surrounded by a substance called "amorphous". The dermal extracellular matrix was stimulated by the Orgon extract and by the mineral fraction BlanE. Indeed, the production of collagen III was particularly stimulated by these extracts; on the contrary it remained unchanged with the nacre control. Collagen I has also been stimulated by the two extracts. Salts are certainly the cause of this stimulation.

The mineral fraction has been also very active in stimulating the expression of laminin-5 protein involved in adhesion between dermis and epidermis, which tends to dwindle with age. This was attributed to the action of calcium chloride. Finally, this extract has proved very effective in stimulating production of collagen IV, specific of basal lamina.

With age, there is a gradual loss of hyaluronic acid that leads to degeneration of the extracellular matrix of dermis followed by loss of protective and mechanical functions of the skin (Meyer *et al.*, 1934). This essential molecule stabilizes intercellular structures by creating a network with viscoelastic fibres of collagen and elastin. It is also a biologically active molecule, inducing an intracellular signalling following its association with a membrane receptor, *i.e.* the CD44. The activation of this receptor causes the regulation of keratinocyte proliferation (Kaya *et al.*, 1997). In this study, the calcium salts do not explain the production of acidic GAGs (Figure 33). Moreover, the lifetime of a glycosaminoglycan being approximately 24 hours, the production of the acidic GAGs observed after 9/10 days has been obviously stimulated by the organic fraction extracted from Orgon limestone. This result is important because acidic GAGs are formed in large part by the hyaluronic acid that allows for moisturizing of skin. In addition it is important for the restructuring of the junction and the strengthening of the papillary dermis (Laurent and Fraser, 1992). Compared to the effect of retinol, the fossil molecules of Orgon have the advantage of simultaneously stimulating the expression of hyaluronic acid.

CONCLUSION

The fossil organic molecules occluded in biogenic limestones are recognized by human cells. They represent a potential source of actives; that is what we have demonstrated by topical application on human skin maintained in survival during 9/10 days.

The organo-mineral active, extracted from Orgon limestone, consisted of calcium chloride, lipids and small proteins mainly. It has exhibited activities in different skin sites:

1. Simultaneous regulation of cell proliferation of keratinocytes and the acceleration of terminal differentiation: a new skin was formed, well regulated, in ten days while maintaining a good morphology of the epidermis.
2. At the same time we have noted a marked increase in the synthesis of acidic GAGs, collagen type I and type III in the papillary dermis.
3. Compared to the activity of modern molecules extracted from nacre, fossil molecules have shown that their activity has been maintained in spite of fossilization.

Mechanistic studies remain to be pursued in relation to the molecular identification. This work establishes for the first time to our knowledge, the biological activity of fossil molecules with an industrial interest. The diagenesis, i.e. geological processing of molecules, appears to have had a beneficial effect on molecules. Indeed, the stimulation of hyaluronic acid was exclusively observed with fossil molecules. This can lead to dermo-pharmaceutical applications with new molecular sources originating from the geological environment.

V.3. Résumé de la publication 4: Activité topique du calcium régulée par l'extrait OrgonW sur peau humaine maintenue en survie

L'idée expérimentale de cet article est d'apporter, avec le calcium, les molécules organiques de biominéralisation capables de réguler son action. Dans ce chapitre on étudie le protocole W qui permet d'extraire la fraction organique soluble dans l'eau pure. Des tests sur peau humaine maintenue en survie ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire Bio-EC de Longjumeau. Les peaux proviennent de plasties abdominales de femmes. Elles sont maintenues en survie dans un milieu BEM (Bio-EC Medium) pendant une dizaine de jours. L'activité sur la peau est analysée après application topique de l'extrait à tester tous les deux jours. Deux types de tests sont ensuite réalisés : d'une part, une analyse de la morphologie des couches (épiderme et derme) de la peau par coloration au trichrome de Masson après 5 et 10 jours. D'autre part, l'activité des cellules a été observée par coloration des glucosaminoglycanes (GAGs) neutres et acides au bleu alcian-P.A.S et par immunocoloration pour les autres activités (collagène, laminine-5). L'extrait testé est obtenu à l'eau (OrgonW) : il est essentiellement constitué de carbonate de calcium et de petites protéines (chapitre IV). Cet extrait a ensuite été décarbonaté à l'acide chlorhydrique puis dialysé afin de dessaler et ainsi de concentrer les molécules organiques : il est nommé OrgonWad. L'activité de ces extraits a été comparée à celle des témoins positif et négatif, i.e. respectivement, la nacre de *Pinctada Margaritifera* et le carbonate de calcium chimique. Ces extraits témoins ont été obtenus d'après le même protocole d'extraction : NacrW et BlanW respectivement.

Tout d'abord, la morphologie de l'épiderme et du derme a été étudiée à 10 jours (Figure 34). Après application topique de l'extrait organo-minéral OrgonW, on constate une nette augmentation de l'épaisseur épidermique avec une bonne morphologie ainsi qu'un épaissement du *stratum corneum*, signe d'un bon renouvellement cellulaire. Il y a une nette activité stimulante épidermique mais présentant une légère spongiose au niveau de la lame basale. Néanmoins, ces altérations sont beaucoup plus importantes avec les autres extraits testés.

Les stimulations les plus intéressantes sont observées dans le derme qui présente un réseau densifié de collagène (étude morphologique à 10 jours). Les marquages confirment que

l'extrait OrgonWad stimule très fortement la production de collagène I (Figure 38) et stimule également celle du collagène III (Figure 39). Ce dernier est intéressant car lié aux tissus jeunes. C'est bien la fraction organique concentrée (OrgonWad) qui induit la stimulation car l'extrait organo-minéral et le blanc (OrgonW et BlanW) n'ont présenté aucune surexpression dans ce cas. Orgon Wad a une action plus stimulante que les molécules organiques extraites de la nacre actuelle (NacrW). Il peut s'agir cependant d'effets dose-dépendant sans qu'il y ait d'effet bénéfique dû à la fossilisation. La très forte activité fibroblastique essentiellement due à l'activité de la fraction organique contribue à la redensification nette, régulière, très dense de fibres modérément épaisses dans tout le derme papillaire.

OrgonWad possède aussi une action très importante au niveau de la restructuration et du raffermissement de la jonction dermo-épidermique (JDE). En effet, il stimule la production de deux constituants essentiels de cette jonction : la laminine-5 (Figure 35) et le collagène IV (Figure 37). Cet extrait permet également l'expression de GAGs neutres (Figure 36), molécules se situant en-dessous de la JDE. Cet effet est comparable à celui de la nacre : la fossilisation a conservé l'activité biologique des molécules. Avec l'âge, la jonction dermo-épidermique peut être altérée et les crêtes épidermiques digitées avec le derme papillaire peuvent progressivement disparaître entraînant alors une JDE aplatie (Marionnet *et al.*, 2006). Cela provoque l'apparition d'une peau fragilisée et plus susceptible aux maladies cutanées. Dans ce domaine, l'extrait OrgonWad qui représente une réserve de 100 tonnes à Orgon, possède une valorisation potentielle intéressante. Pour la jonction dermo-épidermique comme pour le derme, l'extrait organo-minéral (OrgonW) présente moins d'activité : seule une faible stimulation de la production de GAGs neutres et de collagène IV peut être observée. Nous en concluons que la forme des sels de calcium est un élément important de la mise en œuvre de cet élément : avec l'extrait à l'eau le calcium est essentiellement sous forme de carbonate qui présente moins d'effet stimulant que sous forme de chlorure avec le protocole E (chapitre IV). En résumé, le procédé W a permis d'extraire des actifs qui stimulent le derme et la jonction dermo-épidermique. La fraction organique, obtenue en déminéralisant par dialyse, présente l'activité la plus importante et permet le renforcement du derme papillaire et la restructuration de la jonction dermo-épidermique. Si on compare l'activité des extraits fossiles par rapport aux extraits de la nacre fraîche, on constate que la fraction organique a conservée les propriétés stimulantes de la nacre, excepté pour la laminine-5, où la nacre reste le meilleur stimulant.

V.4. Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules

Aurore Dissaux¹, Xavier Bourrat¹, Evelyne Lopez², Elian Lati³, Philippe Gasser³

¹ ISTO, Université d'Orléans/CNRS/Université François Rabelais-Tours (UMR 6113), Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 45072 Orléans cedex, France.

² Museum national d'Histoire Naturelle, BOREA (CNRS/MNHN UMR 7208), 43 rue Cuvier, 75231 cedex 05 Paris, France.

³ Bio-EC, 1 chemin de Saulxier, 91165 Longjumeau cedex, France.

Corresponding authors: Aurore Dissaux, adissau@gmail.com; Xavier Bourrat, Xavier.Bourrat@univ-orleans.fr

ABSTRACT

In skin, cohesion between the dermis and the epidermis is ensured by the dermo–epidermal junction which is also required for control of epidermal growth and differentiation. Here we show that organic molecules regulating the calcium and involved in biological processes related to the formation of mineralized tissues can mediate calcium activity on skin and above all on the dermo–epidermal junction. Molecules were extracted with milliQ water from the bioherm of Orgon (120my old). This quarry is made of more than 99% of calcium carbonate. The study has been conducted on human skin explants maintained in survival for ten days. To emphasize their activity, the organo–mineral extract was compared to pure calcium carbonate as negative control and a fresh nacre extract as positive one. Its acidified and dialyzed extract, concentrating organic molecules, was also tested. This latter showed the main action in restructuring the dermo–epidermal junction: it induced the expression of collagen type IV, laminin-5 and neutral GAGs. In the dermis, it stimulated the production by the fibroblasts of collagens type I and III. Comparing the activities, fossil organic molecules retained stimulated properties evidenced with fresh nacre, and in most cases, the stimulation is even more marked.

Keywords: biomineralization, nacre, calcium, glycosaminoglycane, laminin-5, collagen, keratinocyte, fibroblast, DEJ

INTRODUCTION

The two major compartments of human skin are the epidermis and the dermis. The non-irrigated epidermis receives most of its messages from the dermis (Coulomb *et al.*, 1989). The dermis is primarily extracellular matrix, composed of type I and type III collagens, and elastin, which are synthesized by dermal fibroblasts. Between the epidermis and dermis, the dermo-epidermal junction (DEJ) performs an anchoring function for both layers. It assumes not only a structural role in maintaining tissue architecture and providing anchorage of adjacent cells but also it functions as a barrier to migrating cells, facilitates filtration and is intimately involved in biological processes (Timpl and Dziadek, 1986; Burgeson, 1993). This basement membrane is composed of extracellular matrix molecules including proteoglycans, collagen, and laminins. Together, these proteins create a framework that is essential for communication.

The DEJ is vital for the optimal skin functioning. However, with aging, environmental stress such as photoaging (Rabe *et al.*, 2007), oxidation, or certain diseases, the DEJ can be altered and the rete ridges digitating with the papillary dermis may gradually disappear thus resulting in a flattened DEJ (Marionnet *et al.*, 2006). Stretch marks are another case of degradation due to the weakening of collagen and elastin fibres and the disappearance of rete ridges.

Calcium acts at each layer of skin (¹³). It enables to combat free radicals that could attack the cell membranes and thus accelerate aging. It bonds also to phospholipids which are indispensable for functioning of keratins that will hydrate skin by balancing potassium and sodium (Lopez *et al.*, 2008). In the dermis, we know calcium stimulates fibroblasts (Morvan, 2009). Finally, in the DEJ, calcium ion regulates all exchanges between the dermis and epidermis as its fixing is necessary for the macromolecules forming the basal layer to bond to the collagen (Lopez *et al.*, 2008).

Certain primitive organisms (*i.e.* molluscs) have developed external skeletons in the form of calcareous shells: this is called biomineralization. These shells possess numerous similarities with skeletal human tissue, internal such as bone or external such as the skin. During Cretaceous, rudists succeeded to coral. To protect themselves, they built a shell composed of

¹³ Dissaux A., Bourrat X, Lopez E, Lati E, Gasser P, "Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules"

calcium carbonate mineral deposited on an organic template. Contrary to corals, they stocked and conserved active molecules all along this time thanks to their compact, thick and non porous shell (¹⁴) (Steuber and Rauch, 2005). Moreover, Macchour *et al.* (1998) demonstrated that urgonian deposits of Provence, *i.e.* 120 my old, underwent diagenesis conditions that enabled the preservation of organic matter occluded in the calcium carbonate crystals. Given that we have on Earth extraordinary reserves of these biolimestones, the aim of this work is to study the residual activity of these molecules of calcification in order to compensate losses of calcium: could they be used as actives for skin diseases as it has been proven with molecules extracted from nacre (Rousseau *et al.*, 2006)?

MATERIALS ET METHODS

The limestone was supplied by Omya Orgon (Bouches du Rhone, France). The deposit is dating from the Barremian (Cretaceous, about 120 million years). This deposit of high purity (¹⁵) is used as a source of calcium carbonate for numerous pharmaceutical indications (about 4000 tons / year). The potential activities of four extracts from this limestone have been tested on human skin explants maintained in survival. These activities were evaluated by morphological observations and then with the study of the activity of keratinocytes, characterized by various immunostainings. The protocol provides an extract organo-mineral named OrgonW: mainly proteic with calcium carbonate. Its activity was compared with the ones of positive and negative controls: they are constituted by the actual mother of nacre (NacrW) and precipitated calcium carbonate (BlanW), both extracted under the same conditions. Finally, in order to understand if the activity is due to the organic or mineral part of OrgonW, it was compared with an extract named OrgonWad, representing a concentrate of the organic fraction of OrgonW.

Materials and extractive protocols.

The extract of Orgon limestone was obtained after stirring for 24 hours, 100g of powder (particle size, less than 100µm) mixed with 500ml of milliQ water (Proprietary Treatment, Lopez *et al.*, 2001). The mixture was then centrifuged and the supernatant filtered to 45µm.

¹⁴ Dissaux A, Bourrat X, Lopez E, Barbin V, Barbansson L, Beny JM, Masse JP, "Diagenesis and preservation of biomineralization organic matrix in platform limestones"

¹⁵ Dissaux A., Bourrat X, Gabant G, Cadene M, Gautret P, Lopez E, Trichet J, "Limestones, a source of proteins and lipids"

Finally, the filtrate was lyophilized and named OrgonW. To concentrate molecules of this extract, it was decarbonated by adding hydrochloric acid drop by drop as long as $\text{pH} > 5$ and dialysed to obtain OrgonWad. A negative control was performed with the same protocol, starting with a commercial precipitated calcium carbonate (VWR). It was called BlanW and is purely mineral. A positive control was produced by extracting mother-of-pearl with the same protocol and named NacrW. Mother-of-pearl was obtained from the shell of *Pinctada margaritifera* (particle size less than $100\mu\text{m}$).

Protocol conducted on human skin explants maintained in survival.

Preparation of Explants: the explants were divided into 4 groups of 6 explants for testing the 4 extracts. An additional set of 6 explants has served as 'untreated control' and another set of 3 has served to control skin quality at day 0 (D0). The 33 explants with a diameter of about 10mm were obtained from an abdominoplasty. The explants were placed in survival in the BEM (BIO-EC's Explants Medium) at 37°C in a moist atmosphere with 5% CO_2 .

Treatment: Each extract material was incorporated at a concentration of 1% in a gel of 2% CMC (sodium carboxymethylcellulose) for this work. Topical application was made at a rate of 2mg per explant. The untreated control was treated with CMC alone. The treatment was repeated every two days.

Samples for histology: At D9 (or D10), three explants from each batch were taken and cut into two, one half was fixed in buffered formaldehyde for observing the morphology and the other half was frozen at -80°C . After 24 hours of fixation in buffered formaldehyde, samples were dried and impregnated in paraffin. Sections of 5 microns were made and mounted on slides.

Examination of morphology: The observations were performed on paraffin sections after staining with Masson trichrome, a Goldner variant. Microscopic examination was conducted to assess the general morphology of the dermal and epidermal structures.

Observation of the activity of fibroblasts.

In a second step, the activity of fibroblasts (glycosaminoglycans (GAGs), collagen and laminin-5) was assessed and characterized after 9 or 10 days of topical application (D9 or D10).

GAGs staining: The neutral and acidic GAGs were examined on paraffin sections after staining with alcian blue-PAS.

Immunostaining of collagen I, III, IV and laminin-5: collagens and laminin-5 were stained on frozen sections with polyclonal anti-collagen I, III and IV and a monoclonal anti-laminin-5 by means of a biotin/streptavidin amplifier and a counter staining of nuclei stained with propidium iodide for collagen I, IV and laminin-5 and Masson hemalum for collagen III.

RESULTS

1. In the epidermis: cellular proliferation and acceleration of the terminal differentiation.

The rock extract (OrgonW) and the two control extracts, *ie* the positive one extracted from the nacre of *Pinctada margaritifera* (NacrW) and the negative one extracted from the chemically precipitated calcium carbonate (BlanW), were obtained following the same protocol. OrgonWad was obtained after decarbonatation of OrgonW and dialysis. These four extracts were tested by topical application on series of human skin explants maintained in survival. After 9/10 days, histological sections were prepared and stained with Masson's trichrome. The morphology of skin explants was examined by comparison to the control explant, T, treated with vehicle only (Figure 34).

The control explant (Figure 34a) shows a thick stratum corneum, moderately keratinized at the surface with a slight parakeratosis. The epidermis shows four to five cell layers with fairly good morphology. However, there are moderate intercellular oedemas in the basement membrane. The structure of the dermo-epidermal junction is marked and the papillary dermis shows collagen fibres of medium thickness forming a network more or less dense. After topical application of the organo-mineral extract, OrgonW, the *stratum corneum* presents the same appearance as the control explant whereas the epidermis is acanthotic and shows 7-8

cell layers with good morphology. Moreover, OrgonW shows a strengthening of the papillary dermis: it stimulates the production of thick collagen fibres by the fibroblasts. The mineral fraction (Figure 34d) shows numerous alterations characterized by the presence of cells slightly oedematous in the spinous and basal layers. It can be observed through their clear cytoplasm. After topical application of OrgonWad, a thick *stratum corneum* (Figure 34e) with a slight parakeratosis is observed, ie epidermal cells that form the *stratum corneum* retain the nucleus they should have lost and form squamas. The epidermis is acanthotic but many cells slightly oedematous are visible. The extract has certainly been overdosed. Results obtained with mother of pearl (Figure 34c) are similar to those observed with the mineral fraction but the morphology of the epidermis is markedly altered with many cells oedematous in all the epidermis.

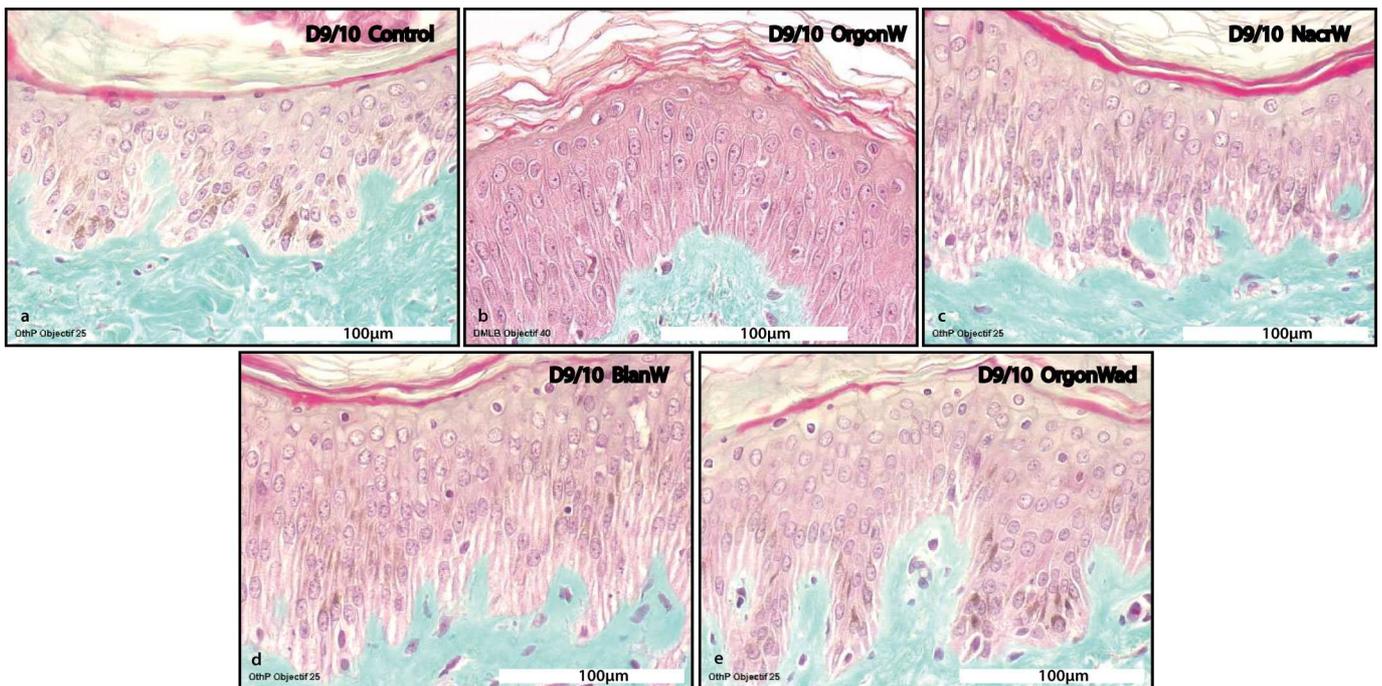


Figure 34. Morphology of explants after Mason's Trichrome coloration 9-10 days.

- a: Morphology of the untreated skin explant (control)
- b: Explant treated with Orgon W: marked increase of the thickness of the stratum corneum
- c: Explant treated with NacrW: observation of physiological disorders
- d: Explant treated with BlanW: several disorders appear
- e: Explant treated with OrgonWad: a slight parakeratosis is observed

2. Dermo-epidermal junction restructuring

Collagen type IV, laminin-5 and the neutral GAGs are involved in the structural reinforcement of the DEJ and allow a restructuring of the architecture and the activity of the junction. Indeed, the DEJ adheres to the dermis and epidermis by the presence of anchoring fibres, such as laminin-5, which allows it to stand various stresses. It is a heterotrimer consisting of α 3, β 3, and γ 2 subunits that associate via large α helical regions to produce a cruciform-shaped molecule (Rousselle *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1996). The expression of this protein is strongly stimulated by the positive control, NacrW (Figure 35c). Its expression is also stimulated by OrgonWad and BlanW where a very clear labelling of laminin-5 forms a band along the scalloped DEJ (Figure 35d and 35e). However, the labelling of this protein after topical application of the organo-mineral extract remains unchanged compared with the control (Figure 35b).

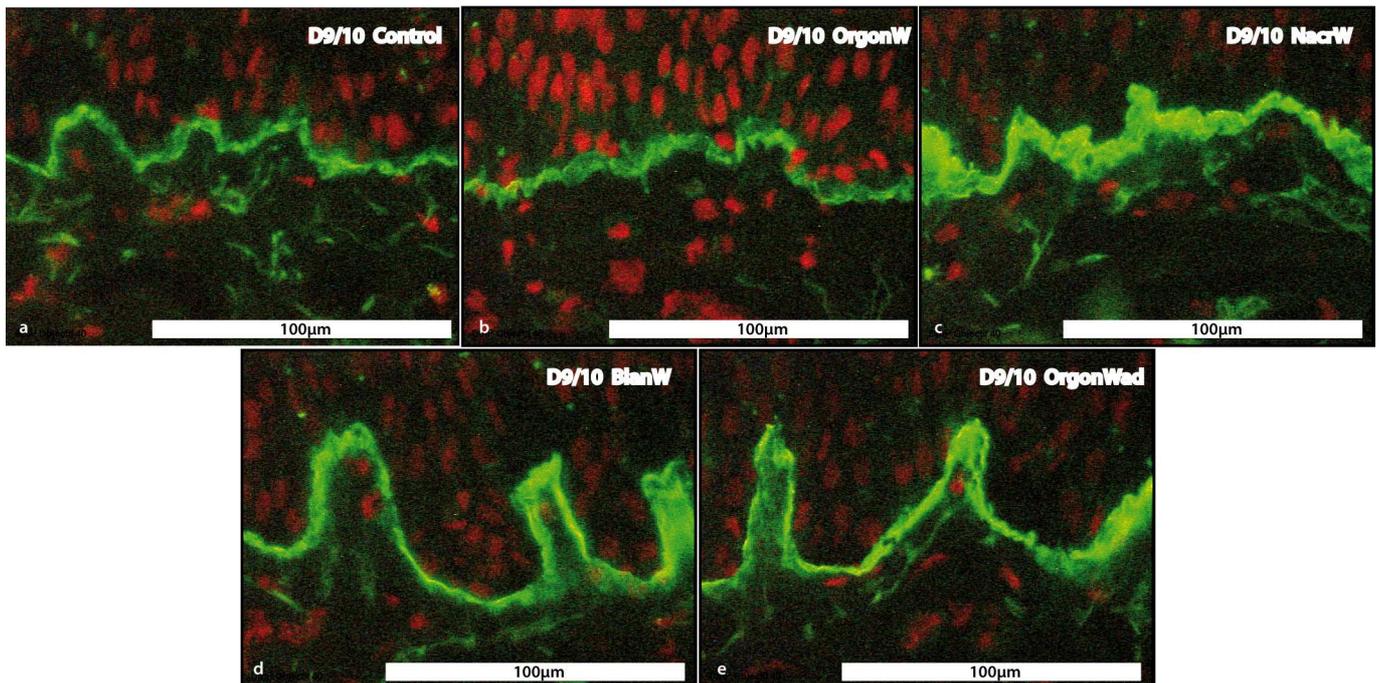


Figure 35. Immunostaining of laminin-5 at 9/10 days

- a: Expression of the untreated skin explant (control)
- b: Explant treated with OrgonW: no change compared with the control, T.
- c: Explant treated with NacrW: strong stimulation of the expression of laminin-5
- d: Explant treated with BlanW: increase of the expression of laminin-5
- e: Explant treated with OrgonWad: increase of the expression of laminin-5

Neutral GAGs participate to the strengthening of the dermo-epidermal junction. They are tanks of growth factors and are found along the DEJ. They also stimulate the mobility of fibroblasts and promote contacts between the extracellular matrix components. They were examined on paraffin sections after staining with alcian blue-PAS. The three extracts, OrgonW, BlanW and OrgonWad strongly stimulate the production of these GAGs compared with the control explant whereas nacre stimulation is lower. Neutral GAGs appear markedly, forming a pink/ purple band, regular and fairly thick along the DEJ (Figures 36b, 36d and 36e). They are also present in the underlying papillary dermis.

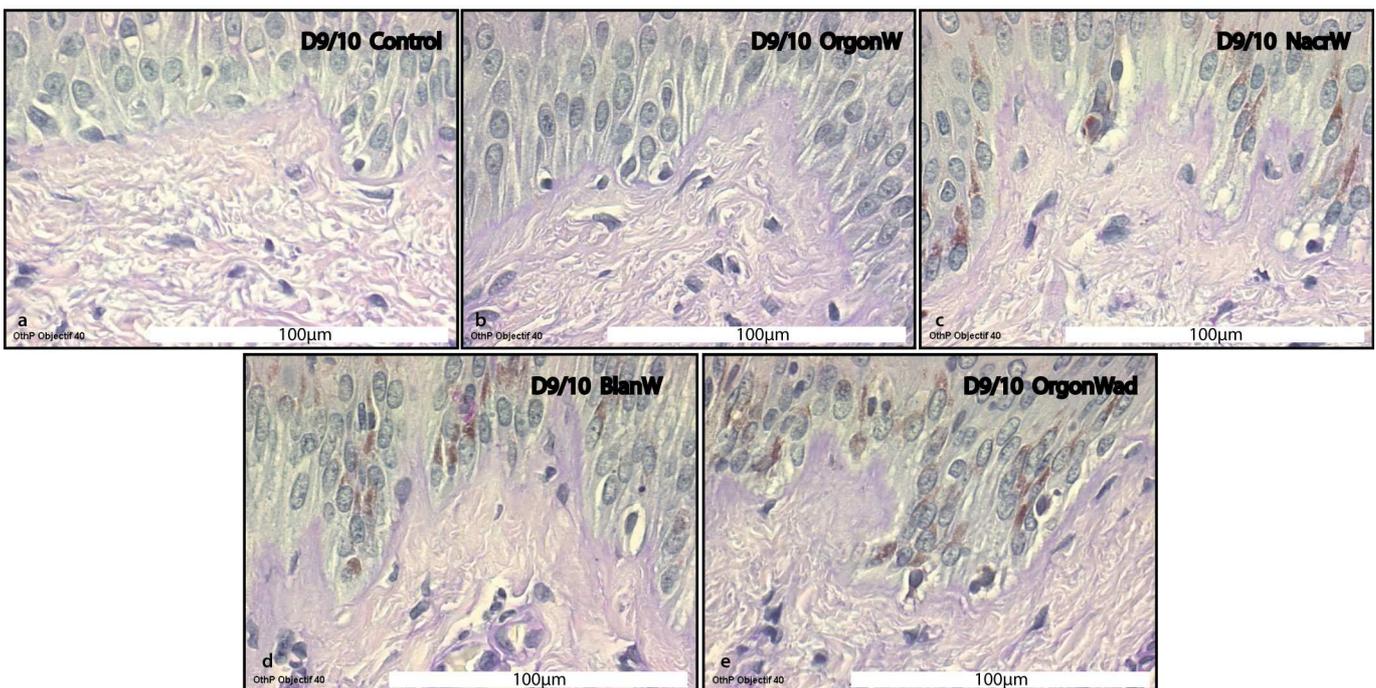


Figure 36. Blue-alcian P.A.S. coloration of GAGs at 9/10 days.

a : Untreated explant (control)

b : Explant treated with OrgonW : we observe a pink/ purple band of neutral GAGs, quite regular and fairly thick along the DEJ

c : Explant treated with the nacre of *Pinctada Margaritifera*, NacrW: very slight production of neutral GAGs
d : Explant treated with BlanW, we observe a pink/ purple band, quite regular and fairly thick along the DEJ representing the stimulation of the production of neutral GAGs

e : Explant treated with OrgonWad : the same pink/ purple band appears representing the stimulation of the production of neutral GAGs

There is no stimulation of the production of acid GAGs.

The basement membrane plays a key role in the mechanical strength of the dermo-epidermal and supplies nutrition with the epidermis. It consists of a frame proteins organized in a lattice where collagen IV is found (Meaume *et al.*, 2005). The latter was immunostained on frozen

sections with polyclonal goat anti-collagen IV antibodies. After topical application during 10 days, we observed a slight stimulation of collagen IV production with NacrW, OrgonW and OrgonWad (Figures 37b, 37c and 37e). BlanW shows a strong immunostaining of collagen IV compared with the control after application of the mineral fraction (Figure 37d): the staining is clear along the DEJ and in the papillary dermis.

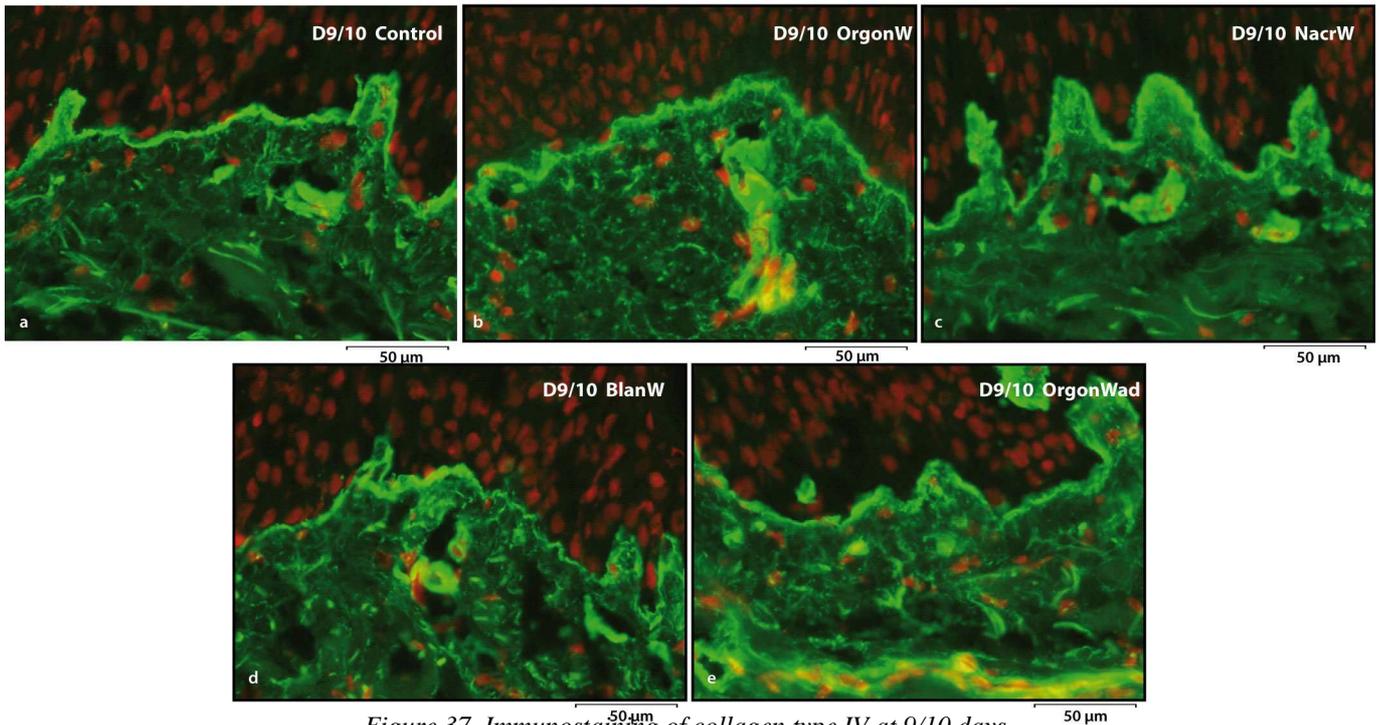


Figure 37. Immunostaining of collagen type IV at 9/10 days

a : Untreated explant (control)

b : Explant treated with OrgonW: stimulation of collagen IV production

c : Explant treated with NacrW: stimulation of collagen IV production

d : Explant treated with the mineral fraction, BlanW : strong stimulation of the collagen IV production along the DEJ, in the dermis and in the basement membrane

e : Explant treated with OrgonWad: stimulation of collagen IV production

3. Papillary dermis strenghtening

The main function of dermal collagen is to give to the skin strength and extensibility while maintaining its structural integrity. Collagens type I and III have been stained in the dermis. Collagen I is the most abundant collagen in the body. It was immunostained with rabbit polyclonal anti-collagen I antibodies. After 10 days, we observe that OrgonWad, strongly stimulates its production. The organic fraction, OrgonWad shows thick fibers of collagen type

I, net and very dense throughout the papillary dermis (Figure 38e). The organo-mineral extract shows no difference compared with the control (Figure 38b). The extracts NacrW and BlanW show a stimulation moderate and very moderate respectively (Figures 38c and 38d).

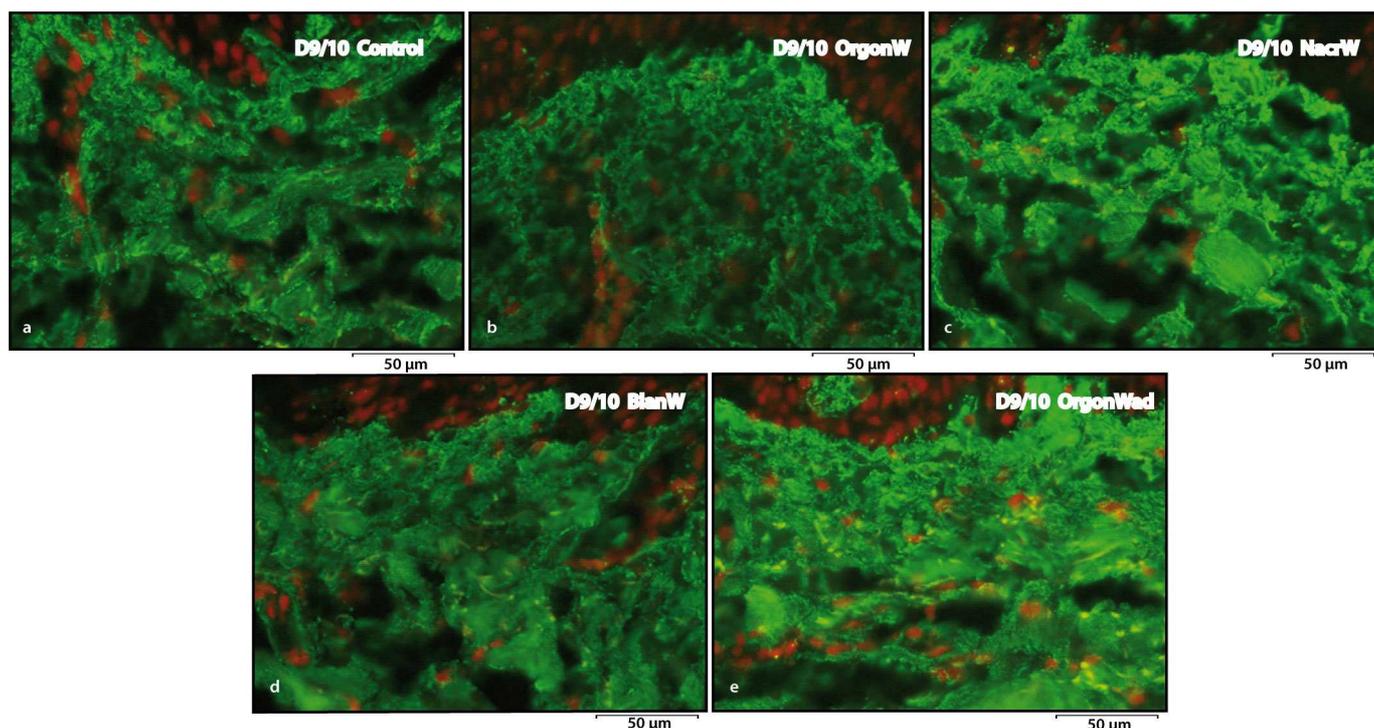


Figure 38. Immunostaining of collagen type I at 9/10 days

a: Untreated explant (control)

b : Explant treated with OrgonW: staining unchanged compared with the control T.

c : Explant treated with NacrW: the production of collagen I is markedly stimulated by this extract

d : Explant treated with the mineral fraction, BlanW: slight stimulation of the production of collagen I

e : Explant treated with OrgonWad: the most important stimulation

The ratio collagen type I on collagen type III is very important. Indeed, in certain diseases such as inguinal hernia, the ratio collagen I / III is reduced and this is manifested by changes on abnormal collagen deposition (Rosch *et al.*, 2002). Collagen III was also determined by immunostaining. The staining is unchanged compared to the control after 10 days of topical application of the organo-mineral extract and BlanW (Figures 39b and 39d). Whereas its production is slightly stimulated after application of OrgonWad and NacrW (Figures 39c and

39e): there is a net and regular staining, very dense with fibers moderately thick throughout the papillary dermis.

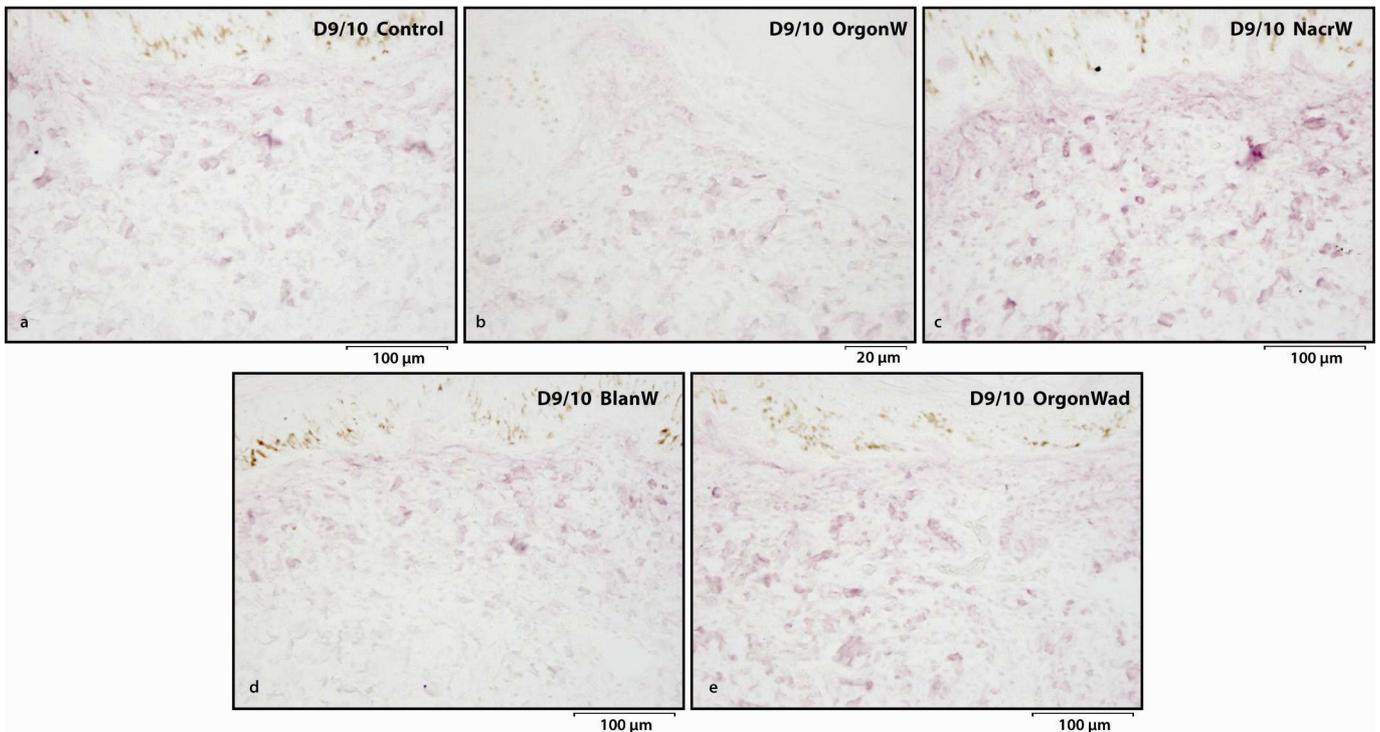


Figure 39. Immunostaining of type III collagen at 9/10 days

a : untreated explant (control)

b : Explant treated with OrgonW: the production remains unchanged compared with the control.

c : Explant treated with NacrW : a stimulation of collagen III production is observed.

d : Explant treated with the mineral fraction, BlanW : the production remains unchanged compared with the control.

e : Explant treated with OrgonWad : a stimulation of collagen III production is observed.

DISCUSSION

The functions and homeostasis of skin critically depend on the stable organization and cohesion between the epidermis and the dermis. They are functionally separated by a basement membrane, also named the dermo-epidermal junction. Ultrastructural observation of the DEJ showed the major constituents to be the lamina lucida, lamina densa and anchoring fibrils. A very strong bonding between this anchoring complex and collagen I of the papillary dermis was recently demonstrated to reinforce this structure (Villone *et al.*, 2008). The DEJ has a physiological role: it influences cell behavior by acting as a selective barrier (Marinkovich *et al.*, 1993, Streuli *et al.*, 1995). In this article, Orgon extracts showed a

restructuring effect on the dermo-epidermal junction related to the production of collagen IV but also the expression of laminin-5 and neutral GAGs, as shown in histological sections. Indeed, basement membranes consist of a network of collagen IV, proteoglycans (neutral GAGs) and glycoproteins (laminin-5). The family of actives is obtained by extraction with pure water. It concentrates small proteins, calcium carbonate and few salts (¹⁶). We compared the residual activity of these fossil molecules to the activity of fresh nacre molecules extracted in the same conditions (water extraction process); Fossil molecules retain activity quite comparable to nacre in quality and intensity.

The lamina densa is mainly composed of type IV collagen, which is the major structural element of basement membrane (Burgeson, 1993). It consists of six genetically different chains ($\alpha 1-\alpha 6$) (Hudson *et al.*, 1993). In the basement membrane, collagen type IV is responsible for anchoring the dermo-epidermal junction to the dermis. This is the first element that is strongly stimulated by the extracts. Indeed, an important overexpression is observed with the mineral fraction but also with the organo-mineral extracts OrgonW and OrgonWad, this latter concentrating the organic fraction. In these three extracts, calcium is in the form of carbonate. The organic fraction has probably not an additive effect compared to carbonate.

Laminins are a family of multifunctional macromolecules ubiquitous in basement membranes and represent the most abundant structural noncollagenous glycoproteins of these highly specialized extracellular matrices (Timpl *et al.*, 1979). They are a family of disulfide-linked heterodimers constituted by the association of three genetically different polypeptides, the alpha, beta and gamma chains, each class containing several variants (Timpl, 1996). The expression of laminin chain variants is spatio-temporally regulated, which suggest that laminin isoforms might have different functions, most importantly as structural elements forming a network throughout the basement membrane to which other collagenous or non-collagenous glycoproteins and proteoglycans attach (Aumailley and Rousselle, 1999). The major adhesive component of epithelial basement membranes is laminin-5 where it localizes to anchoring filaments (Carter *et al.*, 1991, Rousselle *et al.*, 1991). It is found mainly to the lamina densa and partially to the lower lamina lucida (Masunaga *et al.*, 1996) and Yancey

¹⁶ Dissaux A., Bourrat X, Gabant G, Cadene M, Gautret P, Lopez E, Trichet J, "Limestones, a source of proteins and lipids"

(1995) showed that laminin-5 plays also an important role in attaching the keratinocytes to the basement membrane of the epidermis. Laminin-5 is the second element stimulated by fossil molecules. The human skin explants showed, after 10 days of topical application, that OrgonWad and BlanW caused a significant stimulation of the expression of laminin-5 comparable to the one obtained with NacreW. This stimulation is related to calcium and it is difficult to conclude, at this stage, about the role of the organic fraction.

Finally, OrgonWad, BlanW and OrgonW have also an effect on the production of neutral GAGs, produced by fibroblasts. The GAGs are located at the basement membrane. They own variety of functions including permeability, cell adhesion and growth pool (Nanchahal and Riches, 1991). Boyce *et al.* (2002) previously demonstrated on skin substitutes that vitamin C stimulated the production and the organization of the DEJ proteins such as collagen IV and laminin-5. The value of Orgon extracts, and above all the extract concentrating the organic fraction, is that it can also stimulate the production of neutral glycosaminoglycans.

Structural abnormalities or even subtle defects of the anchorage assembly lead to diseases. Santos Garcia *et al.* (2006) demonstrated the loss of continuity in the laminin and type IV collagen expression following an evolution parallel from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. In skin, absence or truncation of a laminin-5 receptor was shown associated with a phenotype of epidermolysis bullosa (Ruzzi *et al.*, 1997) and defective laminin isoforms have been shown to be associated with several inborn and acquired skin diseases. Thus a dysfunction of the DEJ may cause many diseases and with aging, Marionnet *et al.* (2006) showed that the DEJ can be altered. Here it is demonstrated that the activities of fossil molecules allow the restructuring of the DEJ.

The actives, extracted with pure water, act mainly on the papillary dermis and the dermo-epidermal junction. These actives contain small proteins and calcium carbonate mainly. The extract OrgonWad which concentrates the organic fraction has the largest activity and allows the restructuring of the dermo-epidermal junction as well as the strengthening of the papillary dermis by stimulating the production of collagens type I and III. If we compare the activity of the fossil extracts with the one of fresh nacre, fossils molecules associated to calcification retain stimulating properties that are even greater than the ones of nacre, except for laminin-5.

CHAPITRE VI:
Activité des extraits de biocalcaires sur
l'ostéogenèse

VI.1. Introduction

Nous avons établi un modèle *in vitro* afin de tester les potentialités d'ostéoinduction et d'ostéogénèse des matrices solubles de 4 extraits d'Orgon: l'extrait à l'eau; l'extrait à l'eau acidifié et dialysé, l'extrait à l'éthanol et l'extrait à l'éthanol dialysé. Comme nous avons pu l'observer dans le chapitre III, l'extrait à l'eau concentre essentiellement des protéines et du carbonate de calcium et des sels. Afin de décarbonater cet extrait, il a été acidifié : ce protocole permet de concentrer mais il reste également des minéraux et des sels. Enfin, le protocole à l'éthanol permet d'obtenir l'extrait OrgonE qui concentre essentiellement les lipides et les chlorures de calcium mais aussi des petites protéines. Le même extrait a été dialysé et donc dessalé dans le but de concentrer les molécules organiques. Afin de vérifier l'hypothèse de départ, nous avons réalisé des expériences *in vitro* sur des cellules représentatives de différents stades d'évolution de la lignée ostéoblastique, que nous avons mis en présence des différents extraits solubles. Des contrôles positifs et négatifs constitués du milieu cellulaire avec ou sans inducteurs et des témoins négatifs obtenus après avoir extrait du carbonate de calcium pur d'après les mêmes protocoles, ont également été testés.

VI.2. Modélisation *in vitro* des étapes de la différenciation osseuse

VI.2.1. Choix des cellules

Il existe deux types de lignées de cellules osseuses : d'une part, la lignée ostéoblastique comprenant les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes et d'autre part, la lignée ostéoclastique qui comprend les préostéoclastes et les ostéoclastes. Notre but étant d'étudier l'activité ostéogénique des extraits, nous avons choisi la lignée ostéoblastique. Il s'agira alors de démontrer que ces extraits induisent non seulement la différenciation des cellules de la lignée osseuse mais également qu'ils conduisent ces cellules jusqu'à la phase de minéralisation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi trois types cellulaires représentatifs de trois stades de différenciation distincts des cellules de cette lignée : les cellules souches pluripotentes de moelle osseuse, les fibroblastes et les pré-ostéoblastes. Ces cellules correspondent à un stade de différenciation croissant.

VI.2.1.1 Les cellules souches de moelle osseuse

La moelle osseuse est un réservoir de cellules souches : d'une part, le système des cellules hématopoïétiques, i.e. les précurseurs des cellules sanguines, et d'autre part, le système des cellules stromales. Les premières cellules stromales de moelle ont été décrites par Friedenstein *et al.* (1987), à partir de cultures de moelle osseuse, comme étant des cellules adhérentes au plastique, capables de se cloner et de proliférer rapidement. En 2006, l'*International Society for Cellular Therapy* définit les cellules stromales comme des cellules multipotentes isolées à partir de nombreux tissus (moelle osseuse, tissu adipeux, placenta...) et qui associent trois critères : (1) leur propriété d'adhérence au plastique ; (2) leur phénotype, i.e. elles sont dépourvues de nombreux marqueurs de cellules hématopoïétiques et (3) leur capacité à se différencier en 3 lignages : chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes (Diminici *et al.*, 2006). Sous l'effet d'inducteurs spécifiques, les cellules stromales de la moelle peuvent donc se différencier *in vitro* pour exprimer un phénotype ostéoblastique. En effet, il a été prouvé que la dexaméthasone, un glucocorticoïde permettait la stimulation de ces cellules (Maniatopoulos *et al.*, 1988) jusqu'à l'expression des marqueurs du phénotype ostéoblastique et même la formation de nodules de minéralisation.

VI.2.1.2. Les fibroblastes

Les fibroblastes ont été découverts pour la première fois par le Dr. Matthias De Oliveira en 1968. La fonction principale des fibroblastes est de maintenir l'intégrité structurale des tissus conjonctifs en sécrétant sans interruption des précurseurs de la matrice extracellulaire (MEC). La composition de cette MEC va alors déterminer les propriétés physiques des tissus conjonctifs. Les fibroblastes sont des cellules ubiquitaires pouvant donc se différencier en différents types cellulaires. Reddi et Huggins (1972) ont démontré la particularité des fibroblastes de conserver toute leur vie la capacité de répondre à un recrutement et de se différencier en ostéoblastes sous l'effet d'inducteurs spécifiques. Cependant, leur origine et leur voie de différenciation restent peu définies.

VI.2.1.3. Les pré-ostéoblastes

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

VI.2.2. Les inducteurs

Le recrutement des cellules mésenchymateuses et leur différenciation durant l'ostéoblastogénèse sont régulés par différentes hormones systémiques et facteurs de croissance locaux, cytokines et protéines de la MEC, qui agissent de façon coordonnée. Par exemple les membres appartenant à la superfamille des TGF- β sont bien reconnus en tant que régulateurs clés de la formation osseuse (Wozney *et al.*, 1988). Les hormones stéroïdes telles que les œstrogènes, progestérones... sont également bien connus pour leurs effets sur la différenciation ostéoblastique (Syed and Khosla, 2005). Mais l'impact le plus significatif sur l'ostéoblastogénèse provient des glucocorticoïdes (Bellows *et al.*, 1987). En effet, comme on l'a déjà discuté (V.2.1.1), la dexaméthasone est un glucocorticoïde qui stimule la différenciation osseuse à partir de cellules ostéoprogénitrices (Kasugai *et al.*, 1991) et elle est même indispensable pour que la minéralisation se produise (Maniopoulos *et al.*, 1988). Par contre, les ostéoblastes peuvent, eux, minéraliser en l'absence de cet inducteur (Bellows *et al.*, 1987).

VI.2.3. Les marqueurs de la différenciation ostéoblastique

Les connaissances actuelles sur le développement osseux ont été acquises au cours des quatre dernières décennies, grâce à l'identification et à la caractérisation des protéines sécrétées par les ostéoblastes et des protéines associées à la MEC de l'os. La matrice extracellulaire occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). Les principales classes de macromolécules qui composent la matrice organique forment la *substance fibrillaire* (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine), ainsi que la *substance interfibrillaire* (10 %) englobant les glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes, de petites protéines non collagéniques ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation. D'après Nefussi *et al.* (1985, 1989, 1993), il existe quatre étapes pour parvenir à l'étape de minéralisation :

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

Ces différentes étapes ont par ailleurs été confirmées par Stein *et al.* (1990), Owen *et al.* (1990) et Lian and Stein (1995) qui détaillèrent la séquence de l'expression temporelle des gènes des protéines associées à la MEC et de celles sécrétées par les ostéoblastes (figure 1).

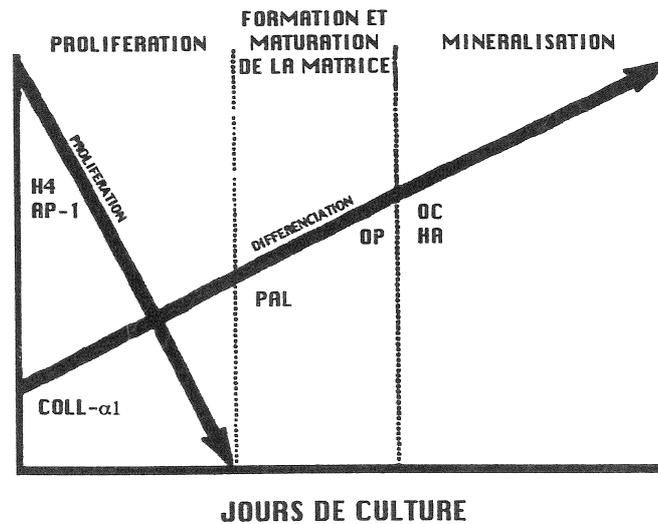


Figure 40. Relation couplée et réciproque entre la prolifération cellulaire et l'expression des gènes de la différenciation (Stein et Lian, 1993). Coll : collagène ; PAL : activité phosphatase alcaline ; OP : ostéopontine ; OC : ostéocalcine

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

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

Les protéines exprimées vont alors constituer des marqueurs spécifiques des différentes étapes du développement osseux. Ceci permet d'identifier les diverses étapes lors de modélisations *in vitro*. Notre choix s'est porté sur les marqueurs utilisés précédemment par Pereira-Mouries (2006) afin d'utiliser les résultats obtenus avec la nacre actuelle comme comparateur : c'est-à-dire la prolifération cellulaire, l'activité phosphatase alcaline, la sécrétion de collagène I, l'ostéocalcine et enfin la formation des nodules de minéralisation.

VI.2.3.1. Collagène de type I

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

VI.2.3.2. Activité Phosphatase Alcaline (PAL)

Immédiatement après la phase de prolifération les protéines associées au phénotype des cellules osseuses sont détectées. C'est le cas de l'activité PAL qui est considérée comme le marqueur du phénotype ostéoblastique le plus précoce (Lian and Stein, 1995). En effet, malgré l'expression de l'activité PAL dans d'autres types cellulaires, elle est particulièrement élevée dans les pré-ostéoblastes et ostéoblastes. Sa fonction dans le métabolisme osseux est liée à son rôle de phosphotransférase. De plus, elle semble hydrolyser les inhibiteurs de la minéralisation comme les pyrophosphates (Henthorn, 1996) et pourrait être un transporteur des ions calcium. Puis l'accumulation de minéral va jouer le rôle de régulateur négatif et le taux de PAL diminue.

VI.2.3.3. Ostéocalcine

L'ostéocalcine est une protéine de 5.7KDa qui est dépendante de la vitamine K. Elle est riche en acide γ -carboxyglutamique (également appelée Bone Gla-protéine) et se lie aux cristaux de calcium de la phase minérale. L'ostéocalcine est considérée comme jouant un rôle clé dans les étapes de différenciation et l'activité des cellules osseuses ainsi que sur leur maturation et la minéralisation de la matrice. Elle est, par ailleurs, exprimée uniquement par les ostéoblastes différenciés (Kasugai *et al.*, 1991) lors de la phase de minéralisation (Owen *et al.*, 1990).

VI.2.3.4. Nodules de minéralisation

C'est l'étape ultime du développement ostéoblastique. Elle se traduit par la formation de nodules qui minéralisent sous forme d'hydroxyapatite. Ces nodules correspondent à un système de cellules superposées dont la couche supérieure se compose de cellules ostéoblastiques cuboïdes produisant une matrice ostéoïde et acquérant progressivement les caractéristiques du « woven bone » (Bhargava *et al.*, 1988).

VI.3. Matériels et Méthodes

VI.3.1. Les protocoles d'extraction

Dans cette partie, trois protocoles d'extraction ont été utilisés et sont détaillés figure 41.

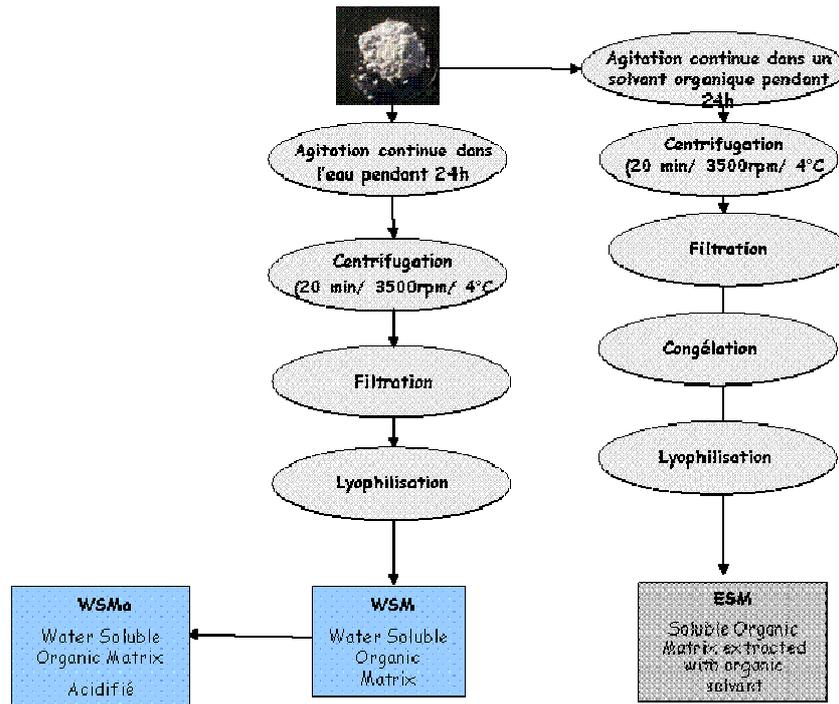


Figure 41. Les différents protocoles d'extraction.

Après chaque extraction, les échantillons obtenus ont été dialysés contre de l'eau milli-Q avec un seuil de coupure à 100-500Da. La composition des extraits a été analysée dans le chapitre III. Les contrôles négatifs consistent en du carbonate de calcium précipité (VWR) extrait dans les mêmes conditions : i.e. à l'eau et à l'éthanol.

VI.3.2. Les cellules étudiées

Les cellules D1 ORL UVA (American Type Culture Collection (ATCC), réf: CRL-12424), cellules stromales multipotentes de souris, ont été mises en culture afin de démontrer que les extraits peuvent induire la différenciation des cellules précurseurs indifférenciées jusqu'au stade d'ostéoblaste actif capable de minéraliser. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu standard : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ATCC) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, ATCC), 0.5% de sulfate de gentamicine (10mg/ml, Institut de Biotechnologies Jacques Boy) et 1% de fungizone (Eurobio). La mise en culture s'est effectuée dans un flacon de 75cm² (Corning, stérile). Une fois le nombre de cellules désiré atteint, les cellules stromales ont étéensemencées à J0 dans des microplaques de 96 puits

(Corning, stérile) pour les tests biologiques à une densité de 5000 cellules/ml et dans des microplaques de 24 puits (Corning, stérile) à une densité de 20000 cellules /ml pour les tests de minéralisation. Dans ce dernier cas, les cultures seront réalisées en présence d'acide ascorbique ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich) nécessaire au métabolisme du collagène (Barnes, 1975), de β -glycérophosphate (10mM) (Sigma Aldrich), source de phosphate organique nécessaire pour l'étape de minéralisation et de dexaméthasone (10^{-8}M) (Sigma-Aldrich). Les extraits testés sont OrgonW, OrgonWad et OrgonE.

Les fibroblastes MRC-5 (ATCC, réf : CCL-171) provenant de poumon humain ont été testés en présence des quatre extraits (OrgonW, OrgonWad, Orgon E et OrgonEd) afin de démontrer le pouvoir ostéoinducteur des échantillons. Ils ont été cultivés dans un milieu Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) enrichi avec 10% de SVF (ATCC), 2mM de glutamine et 1% pénicilline/streptomycine (Penicillin-Streptomycin-Glutamine, ATCC). Les cellules sontensemencées à J0 dans des microplaques de 96 puits (Corning, stérile) à une densité de 5000 cellules/ml. Les extraits sont ajoutés à J1.

Les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 (ATCC, réf : CRL2593) provenant de calvaria (voûte crânienne) de souris, seront un modèle utilisé pour caractériser le pouvoir ostéogénique des extraits (OrgonW, OrgonWad et OrgonE) et ainsi prouver la stimulation des phases terminales de la différenciation ostéoblastique. Les cellules ont été cultivées dans un milieu Minimum Essential Medium alpha medium (α -MEM, Invitrogen) enrichi de 10% SVF (ATCC) avec 2mM de glutamine et 1% pénicilline/streptomycine (Penicillin-Streptomycin-Glutamine, ATCC). Les cellules sontensemencées à J0 dans des microplaques de 24 puits (Corning, stérile) à une densité de 8000 cellules/ml. Les conditions de cette étude ont nécessité l'ajout d'inducteurs de minéralisation : d'une part du β -glycérophosphate (10mM) (Sigma-Aldrich) et d'autre part de l'acide ascorbique ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich). Afin de comparer l'effet des inducteurs, deux répliques de l'extrait testé seront également ajoutés aux puits sans inducteur de minéralisation.

Les milieux ont été renouvelés tous les 2-3 jours et quand les cellules arrivent à confluence, les cultures sont divisées et réparties en trois flacons de 75cm^2 . Dans les modèles de cultures cellulaires *in vitro*, certains nutriments doivent être ajoutés au milieu de culture afin de rendre la MEC apte à la minéralisation. Le facteur de différenciation standard, i.e. la dexaméthasone, représentant le contrôle positif a été ajouté à un volume constant de $15\mu\text{l}$ /puits (excepté pour

les cultures des pré-ostéoblastes). Les contrôles sont effectués en ajoutant le même volume d'eau stérile ou d'extraits BlanW et BlanE. Les différents extraits et contrôles sont ajoutés à J1-J3-J6-J9 et J12.

VI.3.3.L'estimation de la prolifération cellulaire et dosage des marqueurs phénotypiques

Notre choix s'est porté sur les marqueurs utilisés précédemment par Pereira-Mouries (2003) afin d'utiliser les résultats obtenus avec la nacre actuelle comme comparateur : c'est-à-dire, la prolifération cellulaire, l'activité phosphatase alcaline, la sécrétion de collagène I, l'ostéocalcine et enfin la formation des nodules de minéralisation. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'apparition de ces marqueurs spécifiques afin d'évaluer l'activité des extraits testés. Tout d'abord, les couches cellulaires adhérentes sont rincées avec un tampon phosphate salin (PBS, Bioblock) et conservées, tout comme les milieux de culture, à -20°C jusqu'à la réalisation du test.

La prolifération cellulaire a été estimée à l'aide d'un test BCA (acide bicinchoninique) (Kit Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) qui permet de doser le taux de protéines. Il est réalisé sur les couches adhérentes. Il détecte les ions Cu^{1+} qui se forment lorsque Cu^{2+} est réduit par une protéine dans un environnement alcalin. Le produit de la réaction formé par la chélation de deux molécules de BCA avec un Cu^{1+} se colore alors en violet. Une lecture à 562nm permet de déterminer le taux de protéines à partir d'une courbe de standard réalisée avec de l'albumine de sérum bovin.

L'activité phosphatase alcaline a été dosée sur les cellules adhérentes à l'aide du kit Sensolyte™ *p*NPP Alkaline Phosphatase Assay Kit *colorimetric* (AnaSpec). L'échantillon est placé au contact d'un tampon *p*NPP (*p*-Nitrophenyl phosphate). Il se produit alors une déphosphorylation par les phosphatases et *p*NPP se colore en jaune. L'absorbance est lue à 405nm. Une courbe étalon permet alors la quantification des échantillons.

Le collagène soluble total (type I à IV) a été quantifié sur les milieux de culture à l'aide du test colorimétrique Sircol (Sircol Soluble Collagen Assay, Biocolor Ltd). Les échantillons sont incubés avec le réactif Sircol pendant 30min. Le sircol est un colorant anionique avec des

chaînes d'acide sulphonique qui vont réagir avec les chaînes des acides aminés présents dans le collagène. Le colorant non lié est alors éliminé par centrifugation. Le colorant lié est quant à lui, dissout et la densité optique est lue à 540nm. Comme dans les tests précédents, la quantification est réalisée par extrapolation à partir d'une courbe étalon.

Le dosage de l'ostéocalcine a été réalisé par une réaction immunologique de type ELISA (Mouse Osteocalcin EIA Kit, Clinisciences). Le test est effectué sur des aliquotes des milieux de culture. Des anticorps polyclonaux dirigés contre l'extrémité N-terminale sont fixés à une microplaque. Les milieux de culture sont ensuite ajoutés et sont incubés toute la nuit avec des anticorps biotinylés dirigés contre l'extrémité C-terminale. Après plusieurs lavages permettant d'éliminer les anticorps non liés, on ajoute un conjugué marqué à la peroxidase-streptavidine. L'absorbance est alors lue à 450nm et la quantification est réalisée à l'aide d'une courbe étalon.

Les dépôts minéralisés ont été visualisés par une coloration de Von Kossa. Les tapis cellulaires sont fixés avec 1.5% de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich) pendant 10min puis la microplaque est rincée plusieurs fois. Ensuite, 1% de nitrate d'argent est ajouté et la plaque est placée sous lumière intense pendant 45min afin de colorer les dépôts minéralisés. La réaction est stoppée par plusieurs rinçages. Une solution à 5% de thiosulphate de sodium (Sigma-Aldrich) est ajoutée pendant 2min et les puits sont de nouveau rincés. Enfin, une coloration à 0.1% de rouge d'Alizarine (Sigma-Aldrich) pendant 10sec permet de mettre en évidence les cellules de la lignée osseuse à l'origine de ces dépôts.

Des analyses infrarouges ont été effectuées afin de caractériser la forme minérale des dépôts. Pour cela, des spectres infrarouges à transformée de Fourier ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre NICOLET Magna-IR 760 et d'un microscope NICOLET Nic-Plan. Tous deux ont été purgés à l'air sec afin d'éliminer l'eau et le CO₂ atmosphérique. L'échantillon, sous forme de poudre, a ensuite été répandu sur une lame de NaCl. L'aire de l'échantillon analysée est un cercle de diamètre 100µm sélectionné sous microscope à objectif type Cassegrain 15x. Les conditions de l'expérience sont de 128 scans avec une résolution spectrale de 2cm⁻¹ et aucune correction CO₂-H₂O. La gamme de longueur d'ondes étudiée est de 650-4000cm⁻¹ selon le spectromètre et le détecteur du microscope (NICOLET MCT-A).

VI.4. Activité des extraits sur les cellules de la lignée osseuse

VI.4.1. Réponse des cellules fibroblastiques MRC-5

Lors de cette étude, il s'agira de comparer l'effet des extraits d'Orgon, i.e. extraits organo-minéraux et les extraits dessalés où les molécules organiques ont été concentrées, sur les fibroblastes (MRC-5). Le but est de démontrer que ces extraits peuvent stimuler la différenciation des fibroblastes vers un phénotype ostéoblastique, i.e. de cellules capables de minéraliser, et mettre ainsi en évidence le pouvoir ostéoinducteur des molécules organiques de calcification. L'activité de ces extraits est comparée aux blancs, du carbonate de calcium pur, extrait d'après le protocole à l'eau (on obtient la fraction minérale nommée BlanW) et d'après le protocole à l'éthanol (on obtient la fraction minérale nommée BlanE). La dexaméthasone connue pour induire l'ostéogénèse des cellules de la lignée ostéoblastique est utilisée comme contrôle positif. Les marqueurs dosés afin de démontrer la différenciation osseuse vers le phénotype ostéoblastique sont la prolifération cellulaire et la stimulation de l'activité phosphatase alcaline (PAL). Si une augmentation de l'activité PAL est liée à une baisse de la prolifération cellulaire on est donc en phase de différenciation des fibroblastes. Les dosages sont effectués à J1, J3, J6, J9 et J12.

Le contrôle négatif réalisé par ajout d'eau milliQ dans le milieu de culture montre une prolifération cellulaire en hausse et aucune activité PAL (figure 42a): les cellules n'entrent pas en phase de différenciation. La dexaméthasone, inducteur de l'ostéogénèse, montre que la prolifération cellulaire n'est pas affectée (Figure 42b). L'activité PAL mesurée avec la dexaméthasone nous montre une stimulation de l'activité PAL après 12 jours de traitement de Dex à 100mM: la lignée de fibroblastes MRC-5 est capable de répondre à ce facteur de différenciation.

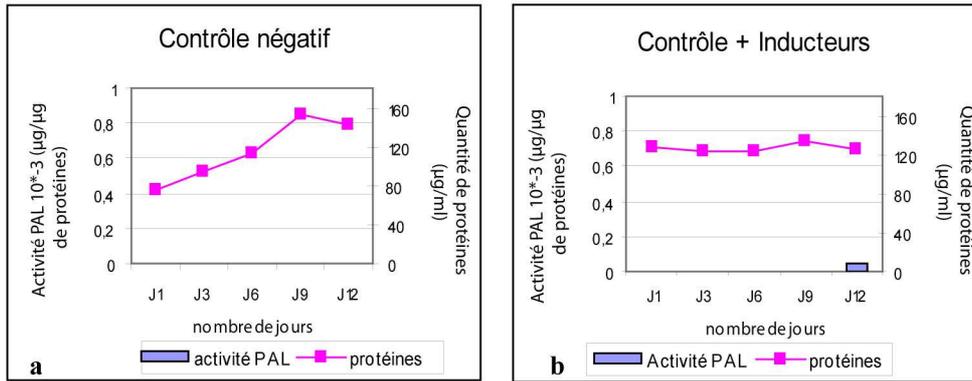


Figure 42. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse au contrôle négatif (a) et au contrôle positif, la dexaméthasone (b).

Les 2 blancs montrent une prolifération cellulaire en hausse stimulée par le calcium. Les cellules sont en phase de prolifération (Figure 43). L'activité PAL mesurée sur les BlanW et BlanE ne montre aucune activité: les cellules n'entrent pas en phase de différenciation.

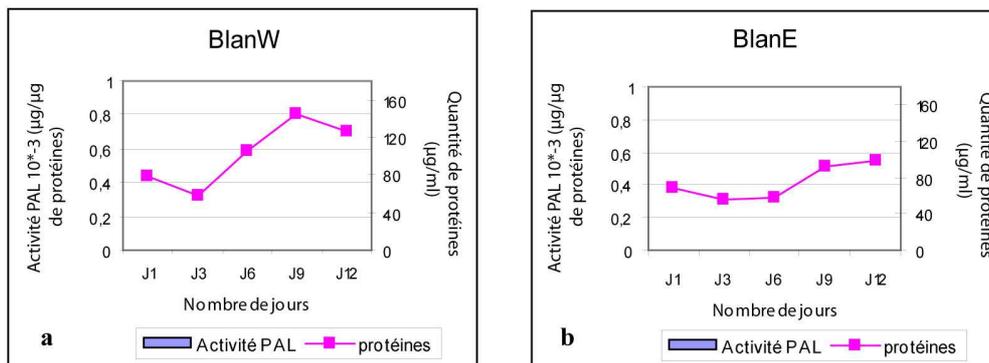


Figure 43. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse au blanW (a) et au blanE (b).

Pour les 3 concentrations de l'extrait OrgonW, les tests BCA montrent une baisse significative de la prolifération cellulaire dès la concentration de 239µg/ml de protéines et ceci dès le 3e jour (figure 44). L'activité PAL mesurée sur les extraits OrgonW à 239 et 774 µg de protéines/ml montre une augmentation de celle-ci dès 12 jours. Cette activité est de plus doublée avec OrgonW[744] (*i.e.* 744µg de protéines/ml) par rapport à OrgonW[239]. L'extrait OrgonW[1200] montre une stimulation de l'activité PAL dès 6 jours: il y a donc un effet dose-dépendant. Cependant dans le cas de la concentration en protéines la plus élevée, on observe une baisse de l'activité PAL à J9 : l'échantillon est certainement trop concentré.

➡ De part la baisse de la prolifération cellulaire et l'augmentation de l'activité PAL, les extraits OrgonW[239] et OrgonW[774] induisent une différenciation des fibroblastes vers le phénotype ostéoblastique.

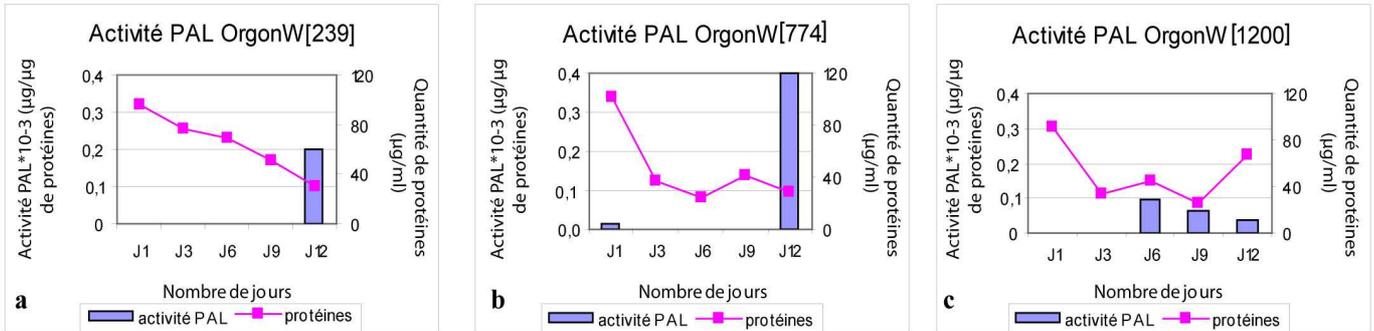


Figure 44. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse à l'extrait OrgonW à 239µg de protéines/ml (a), 774µg de protéines/ml (b) et 1200µg de protéines/ml (c).

Les extraits OrgonWad et OrgonE montrent des effets similaires (annexes 1a et 1b), i.e. une entrée en phase de différenciation vers le phénotype ostéoblastique qui est dose-dépendante. De même, les extraits les plus concentrés, OrgonWad[1300] et OrgonE[857] provoquent des irrégularités dans l'activité PAL : ces échantillons sont certainement trop concentrés.

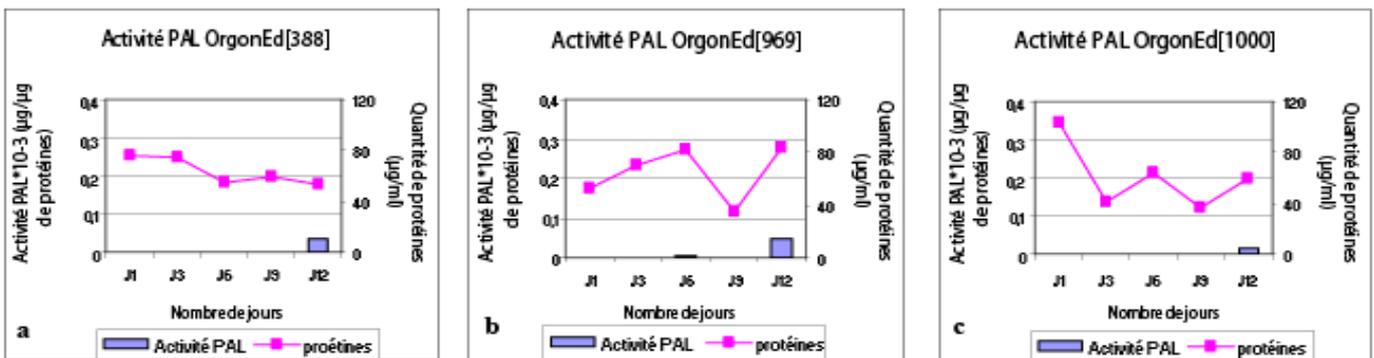


Figure 45. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse à l'extrait OrgonEd à 388µg de protéines/ml (a), 969µg de protéines/ml (b) et 1000µg de protéines/ml (c).

Les courbes des tests BCA pour les extraits OrgonEd aux concentrations de 388 et 1000µg/ml de protéines montrent une baisse de la prolifération cellulaire (Figure 45a et 45c). Cependant,

le test BCA réalisé sur l'extrait OrgonEd concentré à 969 μ g de protéines/ml montre une hausse (figure 45b): les cellules sont toujours en phase de prolifération et ne sont pas entrées en phase de différenciation. De plus, l'activité PAL mesurée sur les extraits OrgonEd aux 3 concentrations montrent une activité PAL à partir de 12 jours. OrgonEd 969, montrant une hausse de la prolifération osseuse et une faible activité PAL, n'est pas entré dans une phase de différenciation précoce. Les 2 autres concentrations d'OrgonEd induisent une baisse de la prolifération cellulaire et une hausse de l'activité PAL qui reste cependant inférieure à celle mesurée avec l'inducteur d'ostéogénèse, la dexaméthasone. L'échantillon OrgonEd sera donc abandonné pour les prochains tests sur les cellules de la lignée ostéoblastique.

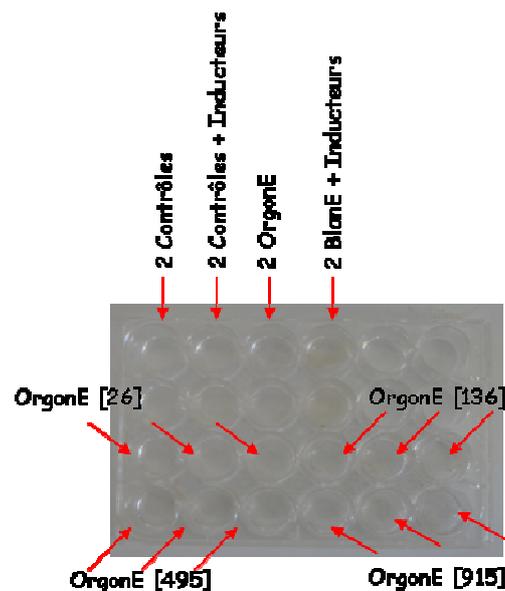
Conclusion sur les réponses des cellules fibroblastiques MRC-5

- ✚ OrgonW, OrgonWad et OrgonE induisent une différenciation des fibroblastes vers le phénotype ostéoblastique qui est dose-dépendante et ceci plus rapidement qu'avec l'inducteur standard, la dexaméthasone. Il y a donc une forte accélération du processus de différenciation stimulée par les extraits organo-minéraux et l'extrait OrgonWad, concentrant les molécules organiques.
- ✚ Les Blancs obtenus à partir d'un carbonate de calcium pur et extraits d'après les protocoles à l'eau et à l'éthanol ne montrent aucune activité phosphatase alcaline et une prolifération cellulaire en hausse: le calcium permet d'expliquer la prolifération cellulaire en revanche la fraction organique contient des molécules « signal » qui permettent l'engagement dans la voie de différenciation des cellules osseuses.
- ✚ Le pouvoir ostéoinducteur des extraits d'Orgon a été démontré.

VI.4.2. Réponse des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1

Nous avons vu précédemment que les extraits d'Orgon induisent la différenciation des fibroblastes vers le phénotype ostéoblastique. Les pré-ostéoblastes sont des cellules de la lignée ostéoblastique, prédifférenciées et capables de minéraliser après avoir atteint un stade de maturation. L'étape suivante consiste donc à mettre en évidence la capacité des extraits d'Orgon à stimuler l'ostéogénèse jusqu'au stade de minéralisation. Pour cela, nous avons utilisés des cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris (lignée MC3T3-E1). L'étude de l'apparition de dépôts minéralisés a été réalisée par coloration de Von Kossa. Une étape supplémentaire de coloration au rouge d'alizarine a été effectuée afin de visualiser les cellules. La présence d'inducteurs de minéralisation étant nécessaire pour observer les dépôts *in vitro*, nous avons analysé les effets des extraits en présence et en absence d'inducteurs (acide ascorbique $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et β -glycérophosphate 10nM).

La figure 46a représente la position des différents extraits ajoutés au sein de la microplaque. Seuls les résultats obtenus avec l'extrait OrgonE sont présentés (Figure 46b) puisque les autres extraits (OrgonW et OrgonWad) n'ont pas formé de dépôts minéralisés (annexes 2a et 2b).



a

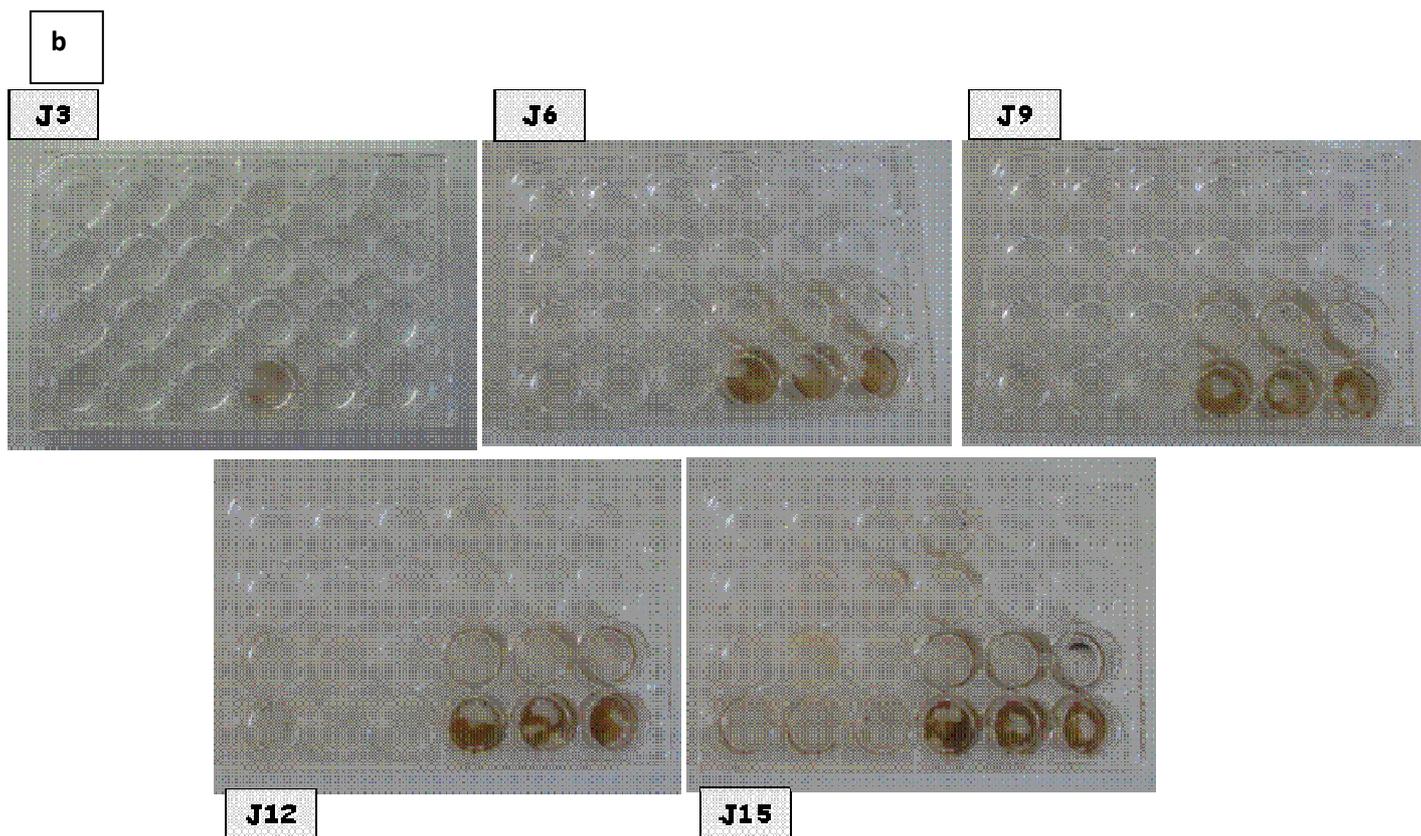


Figure 46. Résultats des tests de minéralisation menés sur les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 avec l'extrait OrgonE aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).

Les contrôles et blancs ne montrent aucune activité. Par contre, à la concentration de 915 μ g/ml de protéines, les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 minéralisent sous l'effet de l'extrait OrgonE dès 3 jours (Figure 46b). Au cours du temps, on constate des dépôts beaucoup plus importants.

Conclusion sur les réponses des pré-ostéoblastes MC3T3-E1 :

- ✚ Le calcium apporté sous forme de chlorure de calcium (extrait OrgonE) semble initier les dépôts minéralisés puisqu'avec le carbonate de calcium apporté par les extraits OrgonW et OrgonWad, il n'y a pas de minéralisation.
- ✚ Le carbonate de calcium pur extrait dans les mêmes conditions ne montre aucune activité. L'extrait OrgonE contient avant tout des lipides et quelques polypeptides. Dans les cultures traitées avec OrgonE à 915µg de protéines/ml, des dépôts minéralisés sont observés dès 3 jours d'exposition. Il s'agit là d'une accélération considérable du processus de minéralisation, puisque les cellules MC3T3-E1 ne minéralisent normalement qu'après 3 semaines (en présence d'inducteurs) (Sudo *et al.*, 1983).

VI.4.3. Réponse des cellules stromales de moelle osseuse D1-ORL-UVA

Les diverses étapes qui mènent les cellules souches mésenchymateuses pluripotentes jusqu'à leur engagement dans la voie de différenciation ostéoblastique pour former les cellules ostéoprogénitrices, puis de celles-ci des ostéoblastes totalement différenciés, ont été étudiées. Les cellules D1 ORL UVA, cellules stromales multipotentes de souris, ont été mises en culture afin de démontrer que les extraits obtenus peuvent induire la différenciation des cellules précurseurs indifférenciées jusqu'au stade d'ostéoblaste actif capable de minéraliser. Dans cette étude, le but principal est de mettre en évidence l'apparition de dépôts d'hydroxyapatite, cristaux qui constituent la matrice minérale osseuse.

L'activité de ces extraits est comparée aux blancs, du carbonate de calcium pur, extrait d'après le protocole à l'eau (on obtient la fraction minérale nommée BlanW) et d'après le protocole à l'éthanol (on obtient la fraction minérale nommée BlanE). Les marqueurs dosés afin de démontrer la séquence de différenciation osseuse vers le phénotype ostéoblastique sont la prolifération cellulaire, la stimulation de l'activité phosphatase alcaline (PAL), la production de collagène et d'ostéocalcine à des concentrations allant environ de 50 à 1100µg protéines /ml. L'étude de l'apparition de dépôts minéralisés a été réalisée par coloration de

Von Kossa. Une étape supplémentaire de coloration au rouge d'alizarine permet de visualiser les ostéoblastes. La présence d'inducteurs de minéralisation étant nécessaire pour observer les dépôts *in vitro*, nous avons analysé les effets des extraits en présence d'inducteurs (acide ascorbique $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et β -glycérophosphate 10nM).

Le contrôle négatif montre une activité PAL à J6, J12 et J15. Cette activité est plus importante que celle enregistrée avec le témoin positif : ceci est certainement un artefact, en effet, l'activité PAL n'est pas spécifique aux cellules osseuses. Une baisse du collagène est également observée à J9 (annexe 5a), cependant d'après le test BCA, les cellules sont toujours en phase de prolifération après 15 jours (Figure 47a). Le contrôle positif, la dexaméthasone, montre une entrée en phase de différenciation à J15 (Figure 47b ; annexe 5b).

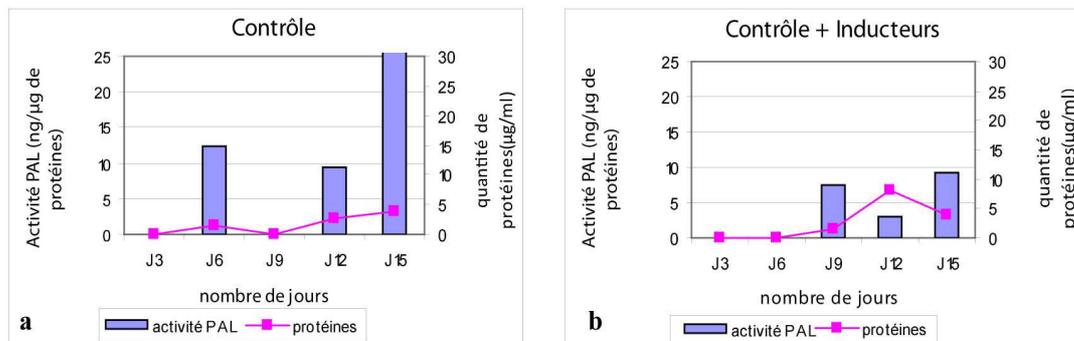


Figure 47. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des cellules stromales pluripotentes, D1 ORL UVA, en réponse au contrôle négatif, de l'eau milliQ (a) et au contrôle positif, la dexaméthasone (b).

Les blancs, blanW et blanE, montrent tous 2 une augmentation de l'activité PAL (figure 48a et b) et une baisse du collagène dès J6 (figure 49a et b). Cependant, BlanW est toujours en phase de prolifération à J15 alors que BlanE entre en phase de différenciation. Dans les 2 cas, aucun dépôt minéralisé n'a été observé, excepté BlanE à J6 (annexes 3a et 3b). Ce dépôt est certainement un artefact ; des analyses complémentaires seront menées afin d'analyser ce dépôt et d'identifier si ces cristaux de calcium sont sous la forme d'hydroxyapatite ou de chlorures de calcium.

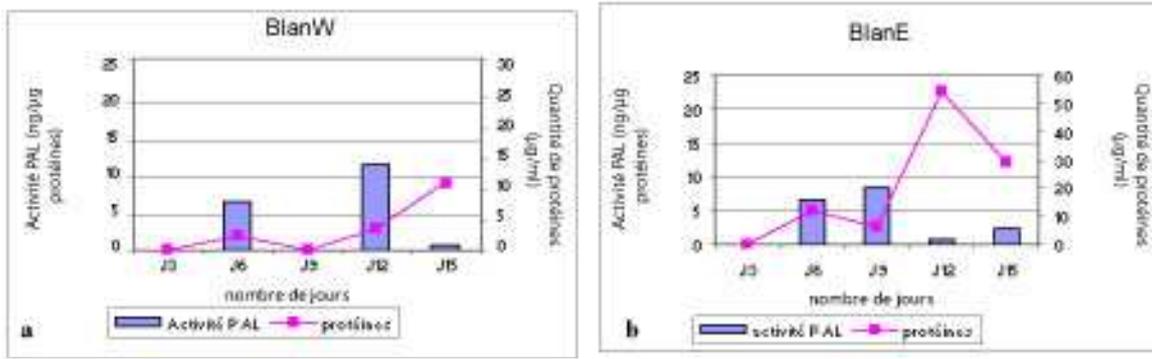


Figure 48. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des cellules stromales pluripotentes, D1 ORL UVA, en réponse au blanW (a) et au blanE (b).

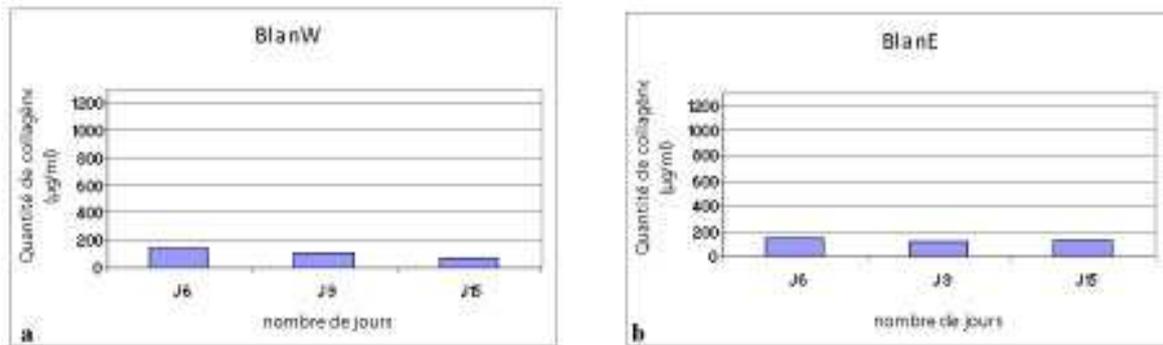


Figure 49. Evolution au cours du temps du taux de collagène total (type I à IV) des cellules stromales pluripotentes, D1 ORL UVA, en réponse au blanW (a) et au blanE (b).

Si on compare l'activité PAL dès 3 extraits testés (Figure 50), on observe pour l'extrait OrgonW une nette augmentation de l'activité PAL, supérieure à celle de l'inducteur, à 12 jours. L'extrait OrgonWad montre une augmentation visible dès 3 jours à la concentration de 619μg de protéines/ ml tandis que cette augmentation est observable dès 3 jours également avec OrgonE mais à une concentration beaucoup plus faible équivalente à 26μg de protéines/ml.

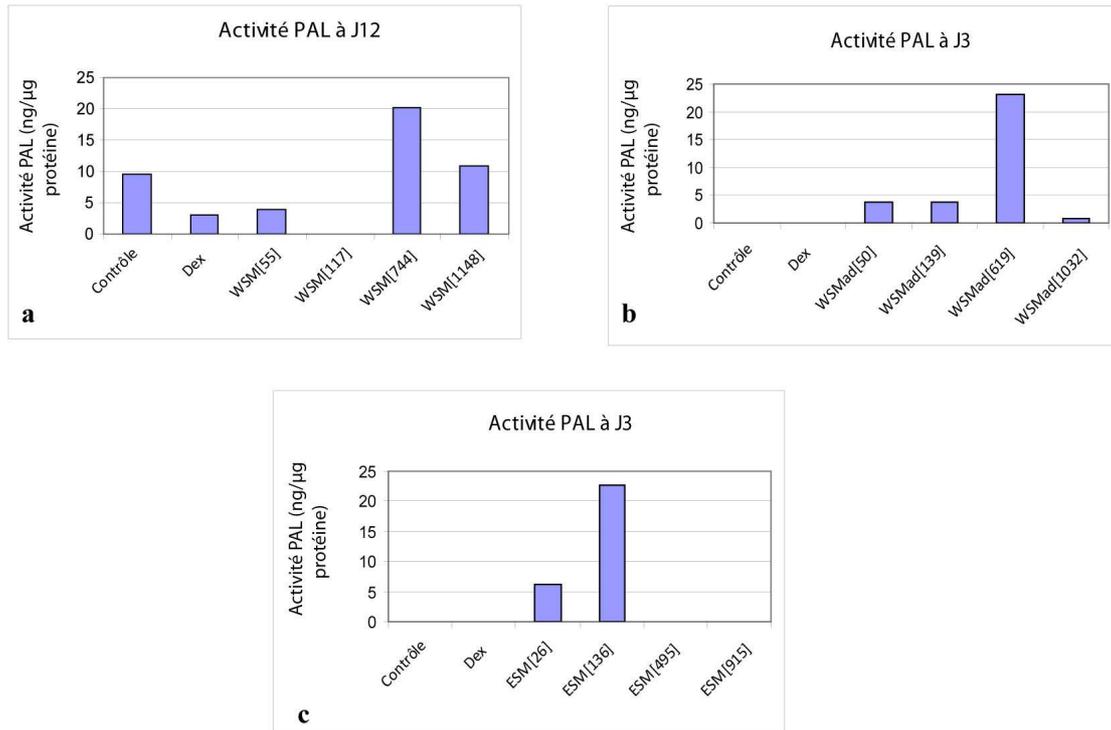


Figure 50. Evolution de l'activité PAL (histogramme) en fonction de la concentration des différents extraits : OrgonW (a), OrgonWad (b) et OrgonE (c) des cellules stromales pluripotentes, D1 ORL UVA.



On observe donc un effet dose-dépendant de ces extraits sur l'activité PAL. De plus, les chlorures de calcium semblent être plus actifs que les carbonates de calcium ; ceci est certainement dû au fait qu'ils sont plus facilement bioassimilables. Cependant, on peut constater qu'à fortes concentrations, les résultats sont difficilement interprétables : les concentrations sont certainement trop élevées.

Les extraits OrgonW et OrgonWad présentent des résultats difficilement interprétables. D'après les marqueurs de la prolifération cellulaire, de l'activité PAL et du collagène total, OrgonW à la concentration de 55μg protéines/ml montre une entrée en phase de différenciation à J15. Les marqueurs d'OrgonW [744] et d'OrgonW [1148] indiquent que les cellules sont en phase de différenciation dès 9 jours (annexes 4a et 5b).

Les marqueurs d'OrgonWad indiquent qu'à la concentration de 50μg et 139μg de protéines/ml, les cellules entrent en phase de différenciation dès 12 jours tandis qu'à la concentration de 619μg de protéines/ml, la phase de différenciation commence dès 9 jours. La concentration la plus élevée est certainement trop importante et ne montre aucune activité PAL (annexe 4b et 5c).

➔ L'effet dose-dépendent est confirmé. Cependant, malgré une entrée en phase de différenciation, aucun dépôt minéralisé n'est visible avec ses deux extraits (annexe 6). De plus, les cellules souches semblent répondre de façon désordonnée aux fortes concentrations : des tests à plus faibles concentrations sont à envisager.

En ce qui concerne l'extrait OrgonE, les marqueurs de la prolifération cellulaire, de l'activité PAL (figure 51) et du taux de collagène (figure 52) indiquent qu'à la concentration de 26µg de protéines/ml, les cellules entrent en phase de différenciation à J15. OrgonE [136] stimule une entrée en phase de différenciation à J12 et Orgon [495] à J9. La concentration la plus élevée ne montre quasi aucune activité PAL : l'augmentation de l'activité PAL s'est certainement produite en amont. En effet, des dépôts minéralisés sont déjà observables à J3 (figure 53).

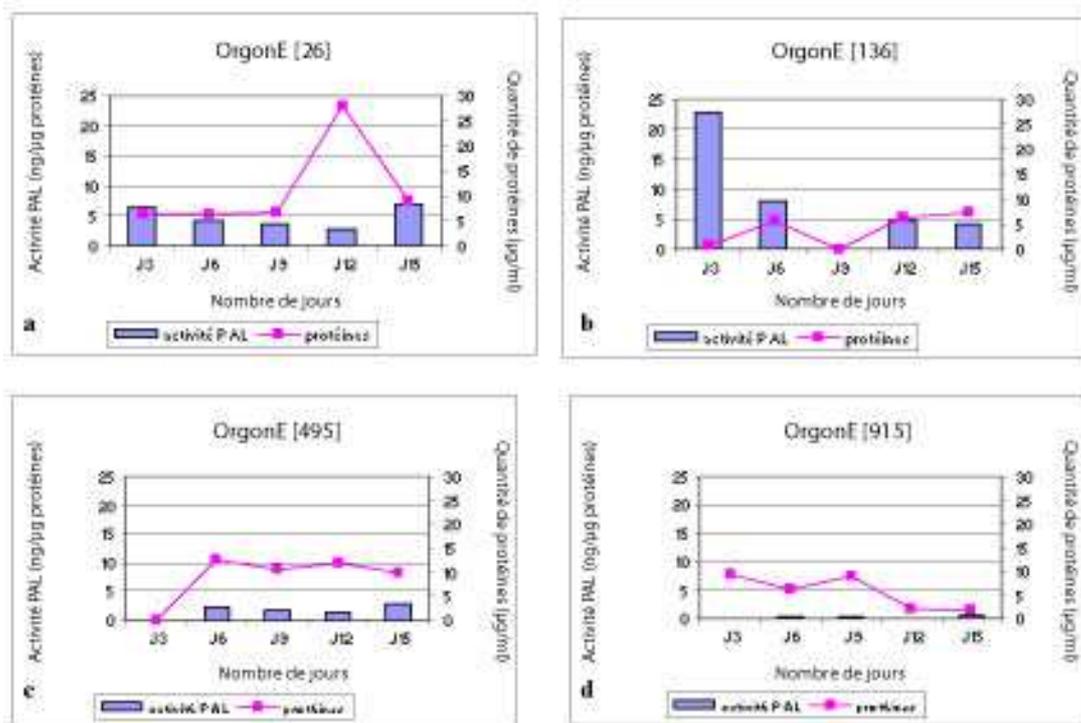


Figure 51. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonE à 26µg de protéines/ml (a), 136µg de protéines/ml (b), 495µg de protéines/ml (c) et 915µg de protéines/ml (d).

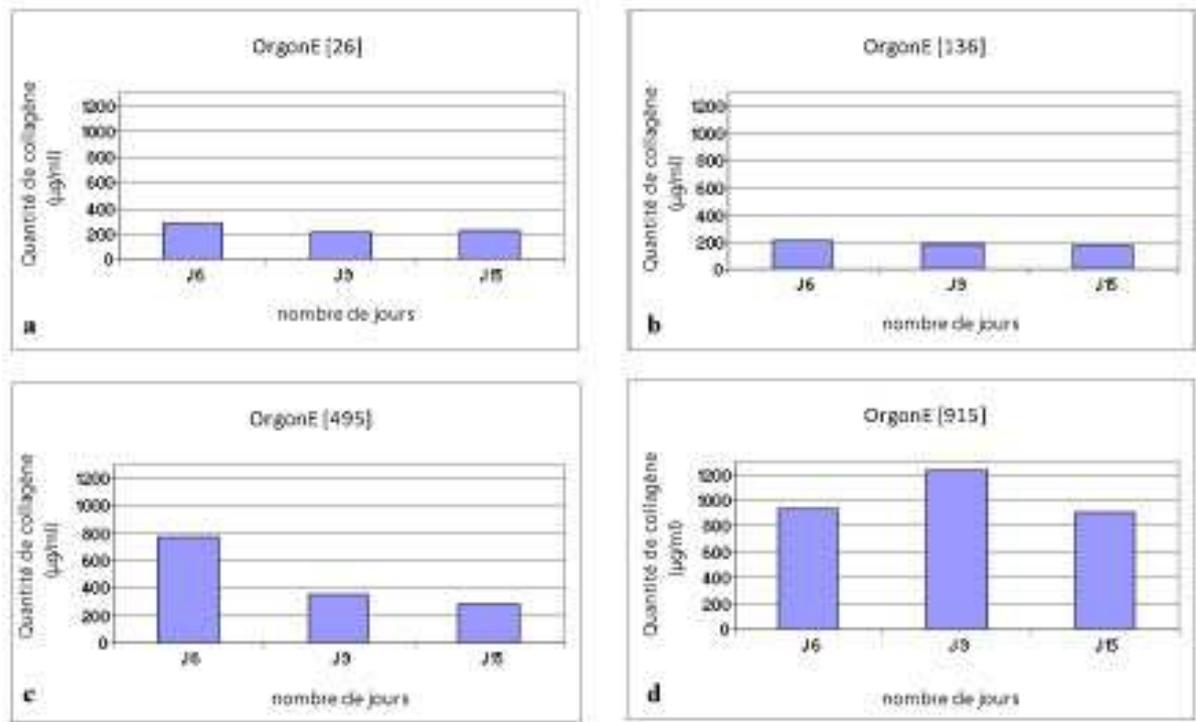


Figure 52. Evolution au cours du temps du taux de collagène total (type I à IV) des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonE à 26µg de protéines/ml (a), 136µg de protéines/ml (b), 495g de protéines/ml (c) et 915µg de protéines/ml (d).

L'effet dose-dépendent est également confirmé avec l'extrait OrgonE. De plus, il est particulièrement visible lors de l'observation des dépôts minéralisés (figure 53b).

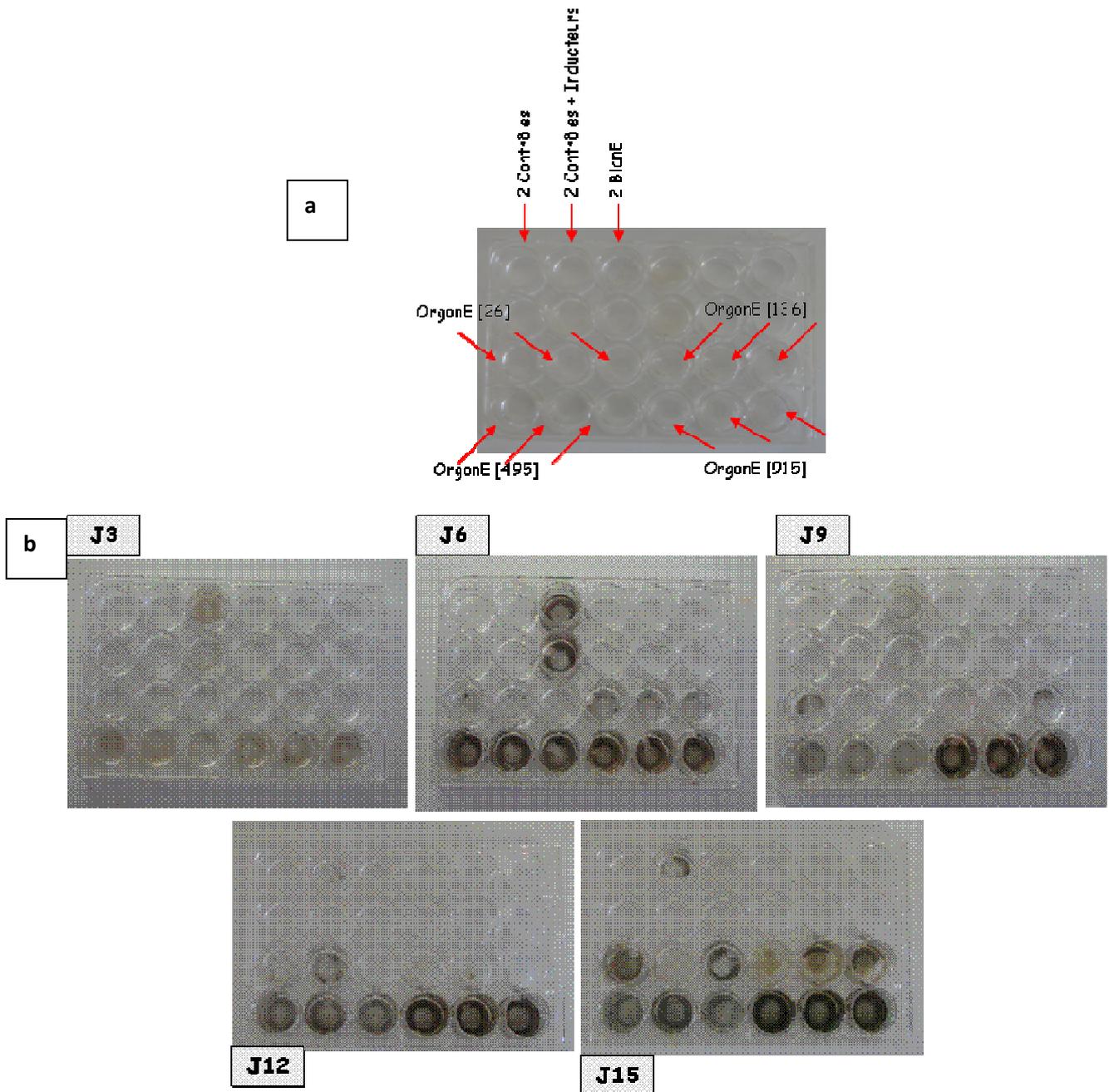


Figure 53. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec l'extrait OrgonE aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).

A la concentration de 495 μ g de protéines/ml, des dépôts sont visibles dès 3 jours. On observe que ces dépôts sont de plus en plus importants avec la concentration et le temps. Il y a donc une relation temps et dose dépendante. Ces dépôts sont visualisés après coloration de Von Kossa tandis que la figure 54 nous montre les dépôts après coloration de Von Kossa suivie d'une coloration au rouge d'alizarine. Cette dernière étape permet de visualiser les ostéoblastes colorés en rouge.

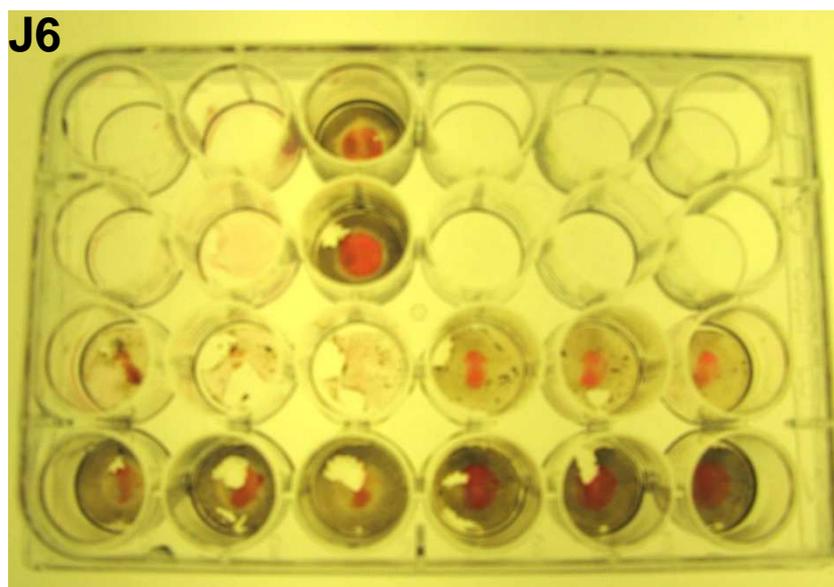


Figure 54. Coloration de Von Kossa + rouge d'alizarine des dépôts minéralisés obtenus avec les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec l'extrait OrgonE aux différentes concentrations à J6. En noir les dépôts minéralisés, en rouge, les ostéoblastes

Le taux d'ostéocalcine a également été dosé. L'ostéocalcine est l'un des derniers marqueurs de la différenciation des cellules en ostéoblastes. En effet, elle est exprimée uniquement par les ostéoblastes différenciés (Kasugai *et al.*, 1991) lors de la phase de minéralisation (Owen *et al.*, 1990). Cependant, son taux a été difficile à doser. Seuls 4 échantillons ont montré une stimulation de la production d'ostéocalcine (annexe 7). La difficulté de quantification de ce marqueur a déjà été constatée dans d'autres études (Pereira-Mouries, 2003).

Conclusion sur les cellules souches D1 ORL UVA

- ✚ Les expériences ont été effectuées sur la base de 3 répliques par concentration. Cette étude a été réalisée dans un but exploratoire afin d'obtenir des données d'ordre qualitatif plus que quantitatif. Néanmoins, pour les prochains tests, il sera nécessaire de multiplier ces répliques.
- ✚ Un comportement dose-dépendant a été mis en évidence. Cependant, à des concentrations trop importantes, les cellules répondent de façon désordonnée : les prochains tests devront être réalisés à des concentrations plus faibles.
- ✚ Avec les 3 extraits OrgonW, OrgonWad et OrgonE, on observe avec les cellules stromales de la moelle, les deux stades du développement de la lignée ostéoblastique : la fin de la phase de prolifération cellulaire, i.e. une baisse du taux de protéines, et l'entrée en phase de différenciation des cellules, i.e. une baisse du taux de collagène et une stimulation de l'activité phosphatase alcaline.
- ✚ Seul l'extrait OrgonE démontre que les cellules sont entrées en phase de maturation, i.e. la dernière phase du développement ostéoblastique, ceci de part l'apparition des nodules de minéralisation visibles dès 3 jours alors qu'ils nécessitent 18 jours lors d'un cycle normal (Hanada *et al.*, 1997).
- ✚ Avec les cellules souches, on obtient des résultats similaires aux tests de minéralisation des pré-ostéoblastes MC3T3-E1: le chlorure de calcium permettrait de faciliter la minéralisation (comparé au carbonate de calcium).

Il s'agit ensuite de caractériser ces nodules de minéralisation afin de confirmer qu'ils sont sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, forme minérale qui constitue l'os. Pour cela, des analyses infrarouges ont été réalisées. La figure 55 montre l'analyse du dépôt minéralisé obtenu avec les cellules stromales multipotentes de souris, après ajout de l'extrait OrgonE à la concentration de 915µg de protéines/ ml après 15 jours de culture.

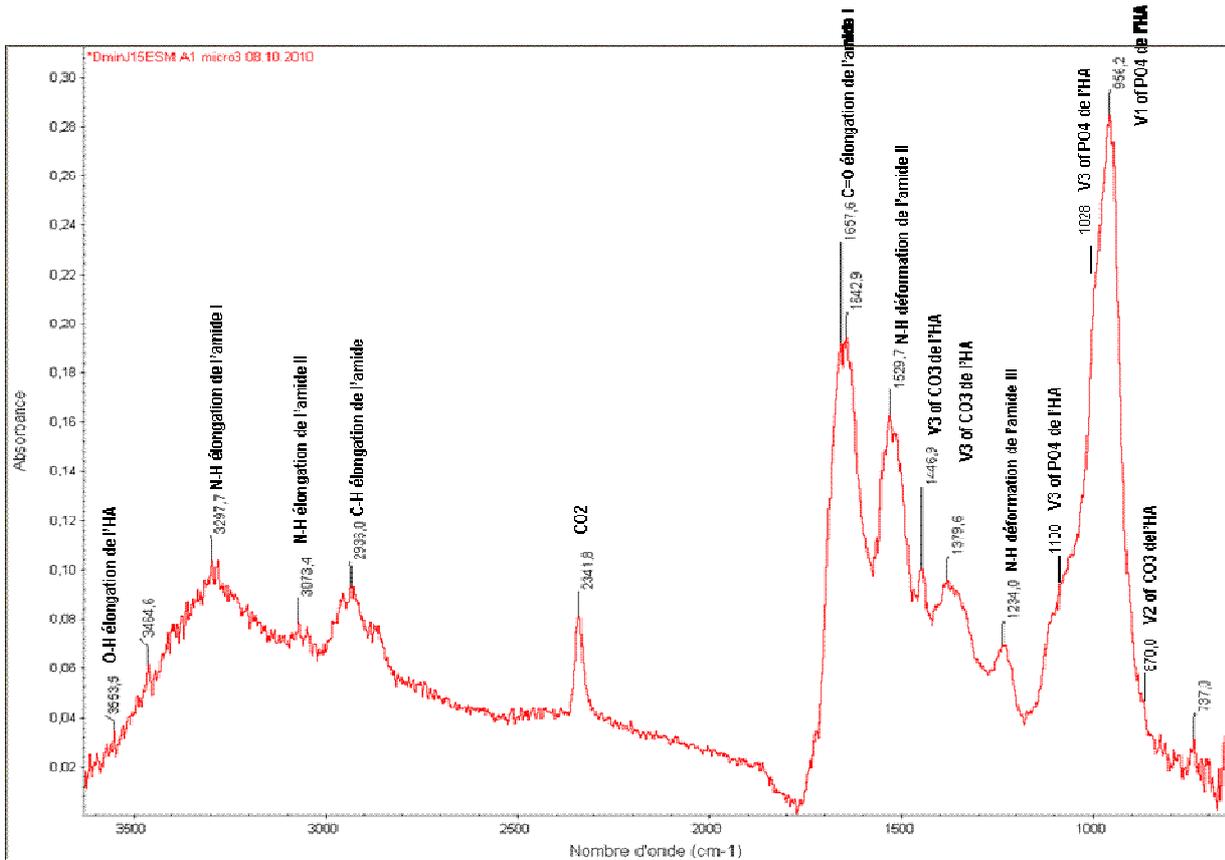


Figure 55. spectre IRTF correspondant au dépôt minéralisé obtenu après ajout de l'extrait OrgonE[915] à J15.

On observe nettement les pics de vibration des amides I, II et III correspondants aux dépôts de collagène présent dans l'échantillon. Les bandes typiques telles que les élongations N-H à ~ 3298 et ~ 3074 cm^{-1} et les élongations C-H à ~ 2936 cm^{-1} des amides sont observées. Les élongations C=O de l'amide I à 1658 cm^{-1} , les déformations N-H de l'amide II à 1530 cm^{-1} et les déformations N-H de l'amide III à 1234 cm^{-1} sont également visibles (Doyle, 1975 ; Payne and Veis, 1988 ; Epaschalis *et al.*, 1997 ; Sonju Clasen and Ruyter, 1997). Le pic de vibration de amide I est généralement important, celui de l'amide II plus faible et enfin celui correspondant à l'amide III beaucoup moins important. Ensuite, on observe les pics de vibrations v_2 et v_3 caractéristiques des carbonates à 870 cm^{-1} , et 1447 et 1380 cm^{-1} respectivement. A 3554 cm^{-1} , on observe la bande des élongations O-H de l'hydroxyapatite tandis que les modes de vibrations v_1 et v_3 de l'hydroxyapatite sont visibles respectivement à 956 cm^{-1} , et 1028 et 1100 cm^{-1} (les modes de vibrations v_2 et v_4 ne sont pas visibles sur ce spectre car leurs pics apparaissent en-dessous de 650 cm^{-1}) (Chang and Tanaka, 2002).

- ✚ Les dépôts minéralisés colorés en noir après coloration de Von Kossa sont donc des dépôts d'hydroxyapatite.
- ✚ Les cellules souches se sont donc engagées dans la voie de la différenciation ostéoblastique jusqu'à l'étape de minéralisation, minéralisation dont les dépôts sont sous forme d'hydroxyapatite.

CHAPITRE VII : **Discussion et Conclusion**

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité biologique résiduelle des molécules fossiles issues de la biominéralisation du calcium, pour des applications pharmaceutiques ou cosmétiques. Dans une première partie les résultats démontrent la préservation de la matrice organique de biominéralisation. Elle a été observée occluse dans les biocristaux. En effet, la microscopie a révélé deux formes distinctes d'inclusions organiques dans les coquilles: des stries de croissance insolubles constituées essentiellement de polysaccharides et de protéines (Voss-Foucart, 1968). Ces films organiques correspondent à la trame organique dans laquelle les cristaux minéralisent sous forme d'aragonite ou de calcite (Levi-Kalisman *et al.*, 2001). D'autre part, des inclusions organiques ont été observées. Ces inclusions correspondent aux molécules organiques solubles, dissoutes et remobilisées au cours de la recristallisation des coquilles au moment de la diagenèse. On estime qu'environ 8% du contenu initial a été préservé. La roche a été analysée: elle est d'une grande pureté avec plus de 99% de calcite non magnésienne. De la kaolinite et des éléments traces tels que du silicium, du magnésium, du sodium et du fer ont été mis en évidence. Les conditions de la diagenèse ont également été examinées et il est important de noter que d'après ces conditions, il y a eu très peu d'apport détritique. Tout ceci permet d'envisager une très grande qualité de stockage et de pureté du contenu organique de biominéralisation en vue de sa valorisation.

La préservation de la matière organique endogène démontrée, la seconde partie du travail consiste ensuite à extraire et caractériser son contenu. L'innovation reportée dans cette thèse est l'extraction de ces molécules par un procédé à l'éthanol (Bourrat *et al.*, 2009). Il est complété par des procédés d'extraction à l'eau milliQ (Lopez *et al.*, 2001) et à l'acide chlorhydrique. Ces extractions ont permis d'obtenir des extraits organo-minéraux d'une part, ainsi que des concentrés de molécules organiques. Nous avons rencontré de nombreuses difficultés à concentrer cette fraction : en effet en concentrant les molécules organiques il a été impossible d'éliminer complètement les sels et/ou les carbonates sans hydrolyser les protéines. De même, les extractions n'ont pas permis d'extraire l'ensemble du contenu organique des échantillons. Les rendements obtenus sont très faibles mais l'aspect quantitatif n'était pas l'objectif premier dans cette étude. En effet, le but recherché était la qualité des molécules extraites, ceci afin qu'elles conservent au mieux leur activité biologique résiduelle.

La composition et la nature des molécules extraites sont variables selon le mode d'extraction. Par exemple, l'échantillon extrait à l'eau a manifesté une insolubilité dans cette eau après lyophilisation de l'extrait. Ce comportement a déjà été remarqué et expliqué par une composition en acides aminés (glycine et alanine) proche de celle des fibroïnes de la soie (Mouries, 2003). D'autre part, les échantillons extraits à l'éthanol et à l'acide ont montré quant à eux, un comportement très hygroscopique. Ce dernier point a été expliqué par la grande solubilité dans l'éthanol du chlorure de calcium, très hydrophile. Analysés en spectroscopie infrarouge, les extraits ont montré la présence de liaisons amides et amines. Les acides aminés et la composition protéique des extraits ont donc été examinés. Une analyse avec et sans hydrolyse des extraits a démontré que les acides aminés étaient assemblés sous forme de polypeptides (Bada and Schroeder, 1972). Le test de quantification des protéines par la méthode BCA a également révélé la présence de polypeptides : l'extrait à l'eau dialysé semblait être le plus riche. Une analyse SDS-PAGE a donc été réalisée afin de déterminer la taille de ces polypeptides. La coloration au bleu de Coomassie n'a donné aucun résultat. Par contre, une coloration au nitrate d'argent, beaucoup plus sensible puisqu'elle permet de détecter des spots contenant 0.1ng de protéines, a révélé des protéines de petites tailles : 12, 18, 20 et 35kDa. Or, les protéines des coquilles de mollusques sont caractérisées par leurs petites tailles : Marin et Luquet (2004) ont montré dans leur synthèse sur les protéines de bivalves que la plus grande protéine, la lustrine A, a un poids de 142.2kDa. Bédouet *et al.* (2006) ont même prouvé la présence d'au moins 110 molécules de poids compris entre 100 et 700 Da dans l'extrait à l'eau de la nacre actuelle de *Pinctada Margaritifera*. Les traînées observées habituellement avec les protéines de la nacre sont ici moins importantes ce qui a permis de distinguer les bandes sur le gel : les extraits renferment probablement moins de glycoprotéines même si la présence de sucres a été démontré sur le spectre infrarouge de l'extrait soluble à l'acide. Deux autres bandes sont observées à ~55 et 70 kDa. Elles ont été assimilées à des artefacts : en effet, d'une part ces bandes sont présentes sur tous les SDS-PAGE analysant les protéines de bivalves (Bédouet *et al.*, 2001 ; Mouries, 2003 ; Marin *et al.*, 2003 ; Marin *et al.*, 2007). D'autre part, un test avec uniquement de l'eau et du carbonate de calcium pur a révélé la présence de ces deux bandes.

Afin de confirmer la présence de protéines endogènes, des tests de racémisation ont été pratiqués en collaboration avec le CBM¹⁷ afin de dater l'âge de ces protéines. En effet, les biominéralisations sont reconnues comme étant de bons échantillons pour ce type

¹⁷ Merci à Marylène Bertrand de l'équipe d'Exobiologie de Frances Westall et André Brack, pour leur aide.

d'expérience (Sykes *et al.*, 1995 ; Griffin *et al.*, 2009). Cependant, la concentration en acides aminés est trop faible, les tests n'ont donné aucun résultat pour le moment. Nous nous sommes donc tournés vers le séquençage des protéines. L'approche *de novo*, dans les banques de données nous a permis d'identifier une homologie des protéines fossiles d'Orgon avec des protéines connues chez les bivalves. Cependant, l'identification était en-dessous du seuil de significativité (significance threshold). De nouvelles analyses sont en cours. L'échantillon analysé était OrgonWad, précédemment fractionné par HPLC afin de concentrer un type de molécules organiques. Or avec le recul, nous savons maintenant que ce procédé d'extraction hydrolyse les protéines au cours de la lyophilisation dû à la présence d'acide chlorhydrique. De plus, l'analyse en HPLC-gel filtration a révélé de nombreux artefacts (lecture des sels inorganiques, des cycles phénols ou même des glycoprotéines). L'échantillon OrgonWd, le plus riche en contenu protéique, va alors être prochainement analysé en nanoLC MS-MS, sans séparation en gel filtration, afin d'obtenir des résultats exploitables.

On constate donc que la composition varie de façon importante selon le mode d'extraction. Par exemple, le contenu lipidique des extraits à l'eau et à l'éthanol a été analysé par chromatographie sur couche mince. Les familles de lipides et les proportions sont différentes selon l'extrait avec tout de même un fort pourcentage de « type squalène » et la présence d'acides gras et de stérols pour les deux extraits. Les familles de lipides identifiées montrent des similarités avec celles identifiées dans la nacre actuelle (Rousseau *et al.*, 2006).

L'extraction à l'éthanol a été réalisée à l'échelle semi-industrielle dans le but d'étudier la faisabilité de ce procédé et son rendement. Ceci a été mené à bien grâce à l'aide de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA d'Orléans)¹⁸. Avec les réserves actuelles de la carrière d'Orgon (environ 30Mtonnes), il est possible d'extraire 1450 tonnes de cet extrait, essentiellement lipidique. En ce qui concerne l'extrait à l'eau milliQ, concentrant essentiellement les polypeptides, il serait possible d'en extraire 100 tonnes type OrgonWad.

En ce qui concerne l'évaluation de l'activité résiduelle de ces molécules organiques, un des objectifs significatifs de ce travail est d'avoir étudié les molécules de biominéralisation fossiles en tant que molécules de régulation de l'action du calcium dans la peau et l'os, le calcium étant sous deux formes distinctes puisque BlanW est essentiellement du carbonate de calcium (CaCO₃) et BlanE du chlorure de calcium (CaCl₂).

¹⁸ Merci à Julie Blachon pour son travail de stage et à Christophe Bostyn et au Pr Henri Fauduet pour la conduite efficace de ce projet.

Sur la peau, l'extrait OrgonE a démontré une stimulation du turnover de la stratification épidermique. Cet actif organo-minéral concentre essentiellement les lipides, quelques polypeptides fossiles ainsi que du CaCl_2 . Cet extrait a stimulé la prolifération des kératinocytes tout en accélérant le processus de la différenciation terminale épidermique. Ce renouvellement épidermique a nécessité 10 jours : l'extrait testé démontre une accélération du renouvellement épidermique comparé à un explant non traité. L'épiderme a conservé une parfaite morphologie démontrant la régulation de l'ensemble du processus. Au niveau du derme, l'extrait a fortement stimulé la production de collagène, type I et III essentiellement. Le rôle biologique du collagène est double. D'une part, avec l'élastine et les glycoprotéines du derme, il est responsable de la cohésion de la peau. D'autre part, le collagène lui confère des propriétés d'hydratation, de résistance, d'élasticité et de souplesse. De plus, avec l'âge, les fibres de collagène se dégradent entraînant la perte de la densité cutanée. Il en est de même pour l'acide hyaluronique : ce glycosaminoglycane acide peut absorber plus de 1000 fois son poids en eau. Il permet donc à la peau de rester hydratée et contribue ainsi à densifier le derme. Dans cette étude, notre extrait stimule sa production par les fibroblastes du derme. D'après les témoins, ni la fraction minérale, ni les molécules actuelles de la nacre ne permettent sa production. Il est par ailleurs très difficile à produire en laboratoire.

L'extrait à l'eau, OrgonW a également démontré un effet sur le renouvellement de l'épiderme, notamment la stimulation de la prolifération des kératinocytes. Cet extrait concentre avant tout des polypeptides et du carbonate de calcium et des sels mineurs (le sodium). Cependant, l'effet le plus marquant provient de l'échantillon OrgonWad, extrait qui concentre les molécules organiques d'OrgonW. Outre la stimulation marquante de la production de collagène de type I et III dans le derme, cet extrait provoque la restructuration de la jonction dermo-épidermique. En effet, il stimule la production de collagène IV, de glucosaminoglycanes neutres et de la laminine-5, trois molécules qui participent au renforcement structurel de la JDE et permettent une très nette restructuration de l'architecture et de l'activité de la jonction. Les actifs extraits à l'eau pure agissent donc principalement sur le derme papillaire et la jonction dermo-épidermique. Si on compare leur activité par rapport aux extraits de la nacre actuelle, on constate que la fraction organique a conservé les propriétés stimulantes de la nacre et, excepté pour la laminine-5, la stimulation est même beaucoup plus importante.

La diagénèse semble avoir eu un effet positif sur ces molécules médiatrices du calcium (Tableau 5). Les lipides semblent jouer un rôle incontestable dans cette stimulation. De plus, on peut supposer que les polypeptides, de plus petite taille que les molécules de biominéralisation actuelles, ont pu ainsi traverser les couches de la peau et atteindre, dans le derme, le site actif du fibroblaste. On peut également supposer que la perte de conformation et de taille de la protéine originale a favorisé l'interaction de la molécule avec le site actif du récepteur du fibroblaste.

Produit / Marqueur	A J5		A J9/J10					
	Ki67	LEKI	GAGs N	GAGs A	Coll I	Coll III	Coll IV	Laminine-5
Orgon E	↘↘	↗	↗	↗↗↗	↗	↗	↔	↘
Blan E	↗↗	↗↗	↗↗	↔	↗	↗	↗↗↗	↗↗↗↗
Nacr E	↗	↗	↗	↔	↗↗	↔	↔	↔
Orgon W	↘↘	↗↗	↗↗	↔	↔	↔	↗	↔
OrgonWd	↗	↗	↗↗	↔	↗↗↗	↗	↗	↗↗
Blan W	↘	↗	↗↗	↔	↗	↔	↗↗	↗↗
Nacr W	↗	↗↗	↗	↔	↗↗	↗	↗	↗↗↗

Tableau 5. Ensemble des activités des extraits testés. Les flèches représentent les variations par rapport à l'explant témoin non traité. En rouge sont indiqués les effets des extraits d'Orgon.

Sur l'os, des expériences *in vitro* ont d'abord été conduites afin d'évaluer l'activité des extraits sur des cellules potentiellement précurseurs des ostéoblastes (les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 et les fibroblastes MRC-5). Dans un deuxième temps, il s'agissait d'évaluer si les extraits permettent de reproduire la séquence complète de la différenciation ostéoblastique (cellules stromales pluripotentes de souris D1 ORL UVA).

Les tests pratiqués sur les différents types cellulaires mettent clairement en évidence un pouvoir ostéoinducteur des 3 extraits (OrgonW, OrgonWad et OrgonE) sur les fibroblastes et un pouvoir ostéogénique sur les cellules de la moelle. Le taux de protéine, l'activité phosphatase alcaline et le taux de collagène sont exprimés selon une séquence spatio-temporelle tout à fait concordante avec une différenciation ostéoblastique (Owen *et al.*, 1990). De plus, on constate une expression dose-dépendante de ces marqueurs. Cependant seul l'extrait OrgonE induit la minéralisation des pré-ostéoblastes ainsi que des cellules stromales

différenciées. Le calcium apporté sous forme de chlorure, plus facilement bioassimilable, permettrait d'initier la minéralisation.

Les cellules stromales de moelle sont un réservoir de précurseurs potentiels de plusieurs types de cellules, i.e. musculaires, adipocytes, fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes (Owen and Friedenstein, 1988 ; de Vernejoul and Marie, 1996). L'extrait OrgonE induit dans cette étude une stimulation complète de ces cellules jusqu'au stade de cellules qui minéralisent. Pourtant, pour cela, il y a nécessité de facteurs spécifiques impliqués dans cette voie : la dexaméthasone ou les protéines morphogénétiques osseuses (BMP-2) (Kasugai *et al.*, 1991 ; Deng *et al.*, 1998). Ici, les extraits montrent une stimulation de la production des marqueurs de la différenciation ostéoblastique accélérée par rapport aux inducteurs standards. Ceci a également été constaté pour les dépôts minéralisés qui apparaissent dès 3 jours pour les deux types de cellules alors que dans la littérature, les dépôts des cellules souches sont normalement observés après 18 jours (Hanada *et al.*, 1997) tandis que les cellules MC3T3-E1 nécessitent 21 jours (Sudo *et al.*, 1983).

Dans ce travail, les minéralisations ont été colorées au nitrate d'argent afin d'identifier les dépôts minéralisés : en effet, le nitrate d'argent se lie au calcium et est révélé sous lumière intense. Cependant, l'extrait OrgonE concentre du chlorure de calcium or les ions chlorures peuvent également former un précipité avec l'ion Ag^+ , précipité qui noircit sous lumière intense. Des analyses en spectroscopie infrarouge ont permis de démontrer que le calcium de ces dépôts a cristallisé sous forme d'hydroxyapatite, forme minérale qui constitue l'os. Des analyses en microscopie électronique à balayage sont également programmées afin de visualiser ses cristaux.

Les résultats sur les cellules souches avec les différents extraits montrent l'hétérogénéité de ce matériel qui ne peut répondre comme des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation. BlanE et BlanW ont montré que le calcium permettait de stimuler la prolifération des cellules mais ces extraits n'ont pas permis une entrée des cellules en phase de différenciation. Les résultats permettent de démontrer l'activité biologique de la fraction organique fossile d'ORGON qui contient des molécules signal ayant conservé un réel potentiel d'action chez l'Homme.

Perspectives

Ce travail représente la première contribution dans le domaine de la valorisation des molécules fossiles en tant qu'actifs pour la santé humaine. Les perspectives sont très encourageantes en ce qui concerne cette nouvelle approche « environnement et santé ».

Il a été démontré que la diagénèse permet de préserver les molécules organiques calcifiantes dans les coquilles de rudistes du gisement d'Orgon. De là, l'idée d'identifier d'autres gisements à forts potentiels afin de démontrer la diversité des sources d'actifs. Au cours de cette thèse, ce travail a déjà été entrepris sur des temps géologiques plus anciens et sur d'autres producteurs de carbonates. 10 échantillons ont été sélectionnés sur lesquels des analyses de géochimie classique ont été menées. Une extraction à l'éthanol a été réalisée sur 8 de ces échantillons, supposés les moins altérés diagénétiquement. Sur ces extraits, on a procédé à des analyses d'acides aminés, avec et sans hydrolyse, ainsi que des analyses en spectroscopie infrarouge. Des tests sur peau humaine maintenue en survie vont être prochainement réalisés. Ce travail devra être poursuivi afin d'identifier des gisements concentrant d'autres molécules potentiellement actives et rechercher des activités différentes.

Au cours de ce travail, il s'agissait de valider scientifiquement l'hypothèse de la conservation de l'activité biologique des molécules fossiles. Le procédé d'extraction actuel permet d'associer la fraction minérale avec la fraction organique. La suite consistera à rechercher un procédé permettant d'extraire uniquement les molécules organiques. Il serait nécessaire de continuer sur cette voie afin de poursuivre la recherche sur les mécanismes spécifiques du complexe moléculaire actuel et l'obtention des principes actifs.

La purification des protéines devra également être poursuivie. Actuellement, une collaboration avec le CBM a été entreprise. Elle a pour but d'isoler et de séquencer les protéines des extraits. Cela permettra de certifier leur origine endogène d'une part, de comprendre leur activité et sur le plan fondamental d'établir quelles sont les molécules signal communes entre les différents règnes, nacre peau ou os.

Dès que la séquence d'un polypeptide actif sera identifiée, on pourra envisager une amplification par polymérase chain reaction (PCR) afin d'identifier plus facilement le mécanisme d'action de ces molécules fossiles. La thèse ouvre ainsi un champ très vaste à une nouvelle pharmacopée liée non plus aux seuls mondes végétal ou marin mais également à l'environnement géologique. Notre approche « top down » passera par le fractionnement du

complexe moléculaire actuel; on envisage, par exemple, la possibilité d'isoler les fractions actives (chromatographie d'exclusion...) et de poursuivre les tests de criblage pour isoler les molécules d'intérêt.

Les études mécanistiques sur peau humaine seront à entreprendre afin de comprendre et analyser les diverses actions des molécules à fort potentiel. Ces tests pourraient être effectués en parallèle sur peau ex vivo et sur peau reconstituées: cela permettrait d'étudier les activités couche par couche ou type cellulaire par type cellulaire.

Les tests menés sur les cellules osseuses au cours de cette thèse ont été réalisés dans un but exploratoire. Désormais, les molécules associées à la calcification des coquilles ont démontré leur pouvoir ostéoinducteur et ostéogène: elles stimulent la formation osseuse. Il sera nécessaire de poursuivre ces expériences dans le but d'identifier les molécules responsables des différents processus que nous avons observés.

UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE



Valorisation des compétences des docteurs

« *Un nouveau chapitre de la thèse* »®

Aurore DISSAUX

Ecole Doctorale Sciences et Technologies de l'Université d'Orléans

Faculté des Sciences et Technologies d'Orléans

Thématique

Mentor : Magali GUILBERT

Présentation orale du « NCT » : 14 juin 2010

Sujet académique de la thèse : « **Etude et valorisation des principes actifs de biominéralisation du calcium pour les applications pharmaceutiques** »

Nom des directeurs de thèse : X. BOURRAT et E.LOPEZ

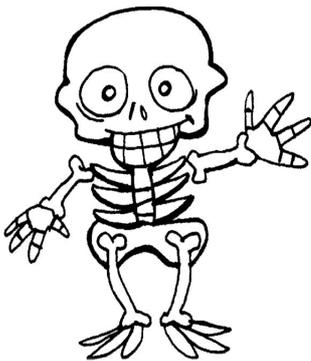
Date de soutenance de la thèse : 16 Décembre 2010



Cadre général et enjeux

Les molécules fossiles au secours de l'homme. Où en sont les recherches ciblées sur la régénération de la peau ? Que ce soit pour un actif anti-âge ou pour soigner les grands brûlés, les scientifiques cherchent à produire des substances qui stimulent les capacités de régénération de la peau. De même pour l'os : serait-il possible de le régénérer ? En effet, les problèmes osseux sont nombreux qu'ils soient traumatologiques, pathologiques ou liés au vieillissement ! Une réponse : **les molécules fossiles** qui se sont accumulées dans certains récifs fossiles de Provence !

Le but de la thèse : Evaluer les potentialités actives des molécules fossiles en partant de l'hypothèse que ces molécules pourraient stimuler la régénération osseuse et/ou la régénération cutanée.



Des chiffres alléchants pour l'industrie cosmétique et pharmaceutique.

A une époque où l'on vit de plus en plus vieux, un nouveau créneau consiste à rester jeune le plus longtemps possible. L'industrie cosmétique a pris la mesure de cet enjeu pour ses consommateurs. A titre d'information, nous dépensons en France en moyenne 205 € par personne et par an pour des soins cosmétiques – soit l'un des plus importants budgets en Europe (source INSEE 2005). Et qui plus est, un marché

lourd : 16.3 milliards d'euros en 2007 (2ème secteur exportateur de l'industrie française en 2008 derrière l'Aéronautique).

En ce qui concerne le marché pharmaceutique, là aussi un marché conséquent par sa taille, il s'avère que très peu de traitements efficaces existent contre l'ostéoporose. Pourtant cette maladie osseuse touchera une femme sur deux au cours de sa vie.

Quelles relations y a-t-il entre peau/os et molécules de bio minéralisation, c'est à dire les molécules permettant la fabrication des coquilles de mollusques, des dents ou des os ? Une homologie de fonction entre l'exosquelette des mollusques et l'endosquelette humain. En termes d'évolution, il y a aussi une homologie de position entre la



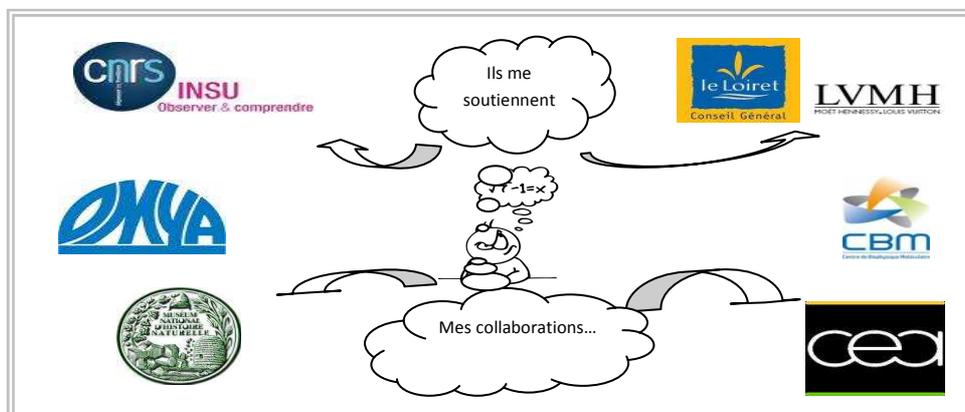
Moi aussi j'ai une coquille issue de la biominéralisation

coquille des mollusques et la peau de l'homme. Nous sommes donc partis du postulat que les molécules ancestrales qui servent lors de la

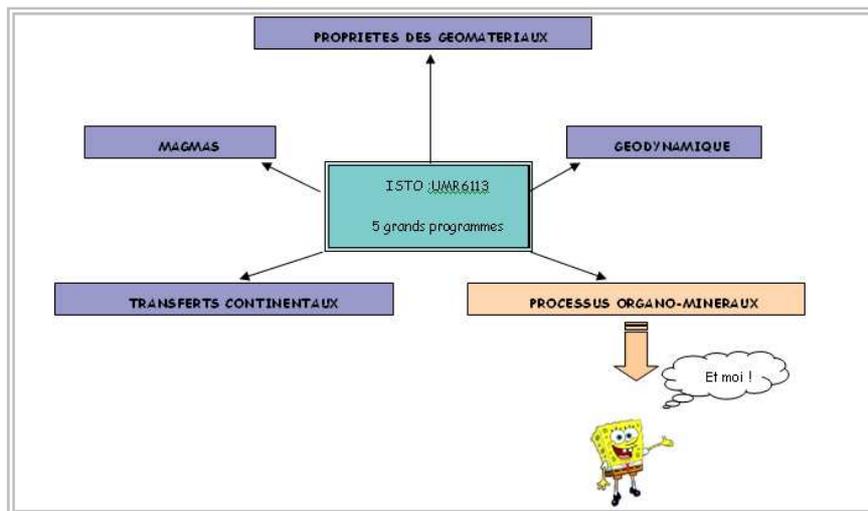
formation de la nacre ont dû conserver ce rôle dans les mécanismes de calcification du squelette chez l'homme mais aussi en régulant le métabolisme de la peau. De plus, on dispose sur Terre de réserves extraordinaires de nacre fossile et nous voulions savoir si ces gisements ne pouvaient pas être valorisés en tant qu'actifs pour les maladies osseuses et/ou cutanées.

Pourquoi les molécules fossiles suscitent un intérêt majeur ? Des premières études menées il y a une vingtaine d'année par le Pr Evelyne Lopez ont montré, d'une part, que certaines molécules extraites de la nacre pouvaient stimuler la formation de l'os chez les cellules animales. D'autre part, cet éminent professeur a également montré que la nacre pouvait renforcer la protection cutanée. Ces travaux ont donc soulevé une double question sur la valorisation possible des molécules fossiles de nacre à des fins médicales et cosmétiques. Ces molécules présentent un double avantage par rapport à la nacre : leur importante quantité et leur prix.

Une thèse aux multiples collaborations privées et publiques. La validation est conduite avec l'aide de la Société Omya qui exploite le gisement d'Orgon du Crétacé inférieur (110 millions d'années) situé dans les Bouches-du-Rhône. C'est le gisement le plus pur au monde avec plus de 99% de carbonate de calcium. Cette thèse est réalisée en collaboration avec le Museum National d'Histoire Naturelle ainsi qu'avec d'autres laboratoires du CNRS d'Orléans (le Centre de Biophysique Moléculaire) mais également avec des entreprises privées afin de mener des tests, par exemple, sur explants de peau humaine. De plus, une collaboration extérieure au sein de l'Agence Nationale de la Recherche gérée au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) m'a été proposée.



Une thèse réalisée au sein de la Cosmetic Valley. Cette thèse est réalisée au sein du laboratoire de l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO), dans le grand programme « Processus Organo-Minéraux (POM) », sous la direction de X. BOURRAT et d'E. Lopez. Ce travail est financé par le conseil général du Loiret et le CNRS, en partenariat avec LVMH. Il a mobilisé 3 personnes pendant 3 ans, cependant, menant une thèse de biologie dans un laboratoire de géologie, les compétences nécessaires étaient limitées. Disposant de réels moyens financiers mais en revanche peu de moyens matériels, ceci m'a conduit à mettre en place un laboratoire stérile de A à Z afin de mener des expériences sur cellules osseuses. Ce sujet s'inscrit une nouvelle thématique environnementale s'intéressant aux relations existant entre « Environnement, Géochimie et Santé ». Il nécessite donc une approche multidisciplinaire telle que la géologie, la géochimie, la biologie, la recherche médicale,... Très innovant, les recherches effectuées dans ce domaine sont rares.



Les raisons de ce choix de thèse. Un choix de thèse en droite ligne avec ma formation, mon expérience et mes motivations personnelles, pour le secteur d'activité. En effet, depuis petite la biologie m'a attirée ; en passant le fait qu'à 7 ans, j'avais déjà un microscope et la panoplie assortie et à 11 ans j'avais le kit de chimie, la recherche en biologie est un chemin que j'ai suivi naturellement.

Dans le cadre d'un sujet déjà bien défini avant mon arrivée, j'ai conduit cette thèse avec un fort degré d'autonomie dans la planification des travaux (temps et protocoles), la mise en place et la gestion des moyens... J'y ai mis à la fois de la rigueur, de la ténacité, beaucoup d'énergie et d'enthousiasme pour atteindre ces résultats.

Une expérience enrichissante en termes de prise en main de projet, de conclusions scientifiques majeures (brevet validé, publications en cours de rédaction) qui peuvent avoir des applications rapides en entreprise. Au cœur de la Cosmetic Valley, ma thèse s'inscrit donc dans les thèmes de recherche actuels et novateurs.



3 ans de recherche : Comment ? Quels résultats ? Quels coûts ?

CADRAGE (0mois)

Un projet déjà clairement défini :

- Collaborations
- Financement
- Test de pré-validation



Bilan pour moi et mes partenaires :

Un démarrage bien cadré. Par contre, arrivée difficile dans le laboratoire dû à un environnement hostile : en effet les collègues ne croyaient pas en mon sujet de thèse. J'ai finalement réussi à démontrer la validité de mon sujet suite aux résultats obtenus. Capacité d'adaptation à un sujet ayant pour background « la géologie » n'ayant fait aucun cours dans ce domaine.

PROTOCOLES (6mois)

- Collecte et Lecture de la biblio
- Elaboration des meilleurs protocoles (quanti + quali)
- Caractérisation des extraits



Bilan pour moi et mes partenaires :

Une étape où j'ai travaillé sur de nombreux équipements différents, cependant difficultés rencontrées dans la caractérisation des extraits : dans de nombreux cas, je me suis retrouvée en-dessous de la limite de détection donc impossibilité d'obtenir un résultat. Cela m'a permis d'accepter et de prendre du recul sur le fait de ne pas systématiquement obtenir un résultat positif. Afin de résoudre ce problème, des collaborations ont été mises en place.

EXPERIMENTATION (18mois)

- Collaboration pour la réalisation des tests sur peau humaine
- Mise en place d'un laboratoire stérile de A à Z
- Elaboration des protocoles
- Réalisation de tests sur cellules



Bilan pour moi et mes partenaires :

Le cœur du projet. Mise en place des collaborations, obtention de résultats et gestion d'un projet quasi autonome (organisation de l'activité globale, gestion d'un budget, élaboration et réalisation des tests) pour la mise en place d'un laboratoire de cultures cellulaires au sein d'un laboratoire de géologie = expérience qui fut très formatrice. Première expérience d'encadrement.

COMMUNICATION (6 mois)

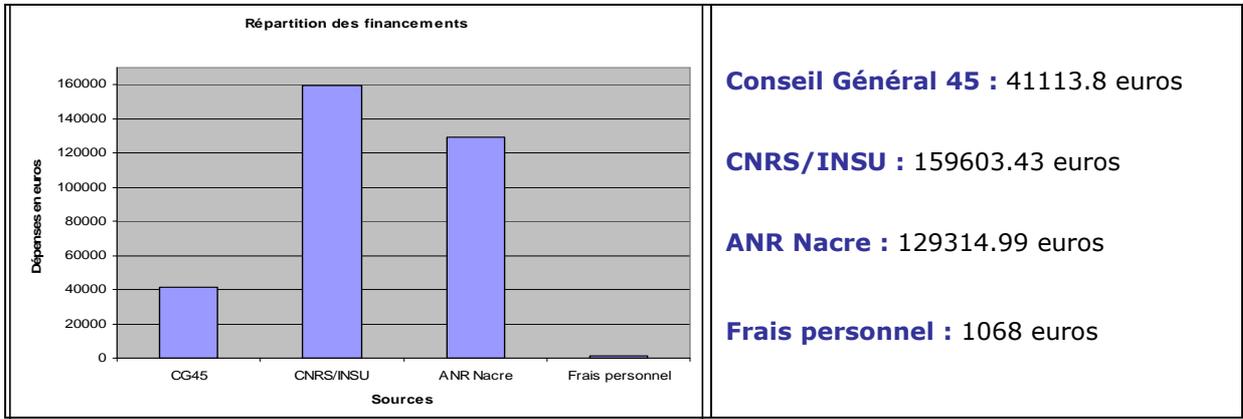
- Participation à des congrès (communications orales et écrites)
- Publication d'articles
- Publication d'un brevet
- Présentations en interne
- Rédaction du manuscrit de thèse



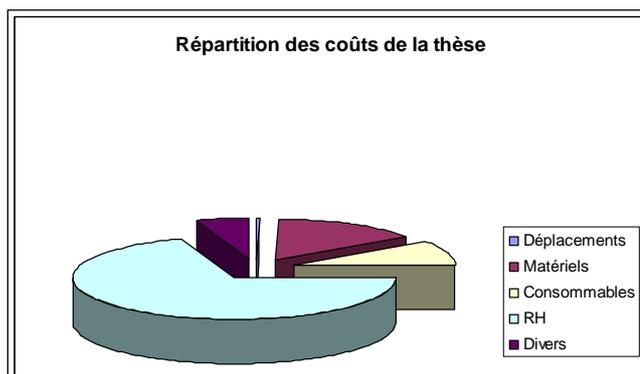
Bilan pour moi et mes partenaires :

Expérience complète qui s'est conclue par la communication des résultats. Facilité dans les présentations (orales et écrites) et expérience dans la rédaction d'articles. Publication d'un brevet. Prise de contact avec les entreprises pour mon « après thèse ».

Le financement de ce travail : Ma thèse est financée par le Conseil Général du Loiret et le CNRS/INSU. J'ai également eu la chance de bénéficier d'un budget assez important de l'ANR Nacre. Le graphe ci-dessous permet de visualiser les différents financements qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.



La répartition des coûts : Le budget le plus important concerne les ressources humaines représentant quasi 70% du coût de la thèse. Ensuite, le matériel avec 14.76% du budget (mise en place d'un laboratoire stérile) et enfin on trouve les fournitures expérimentales (en raison d'un besoin en matériel très spécialisé), soit 9.66% du budget. Un fait important dans cette gestion budgétaire : j'ai eu l'opportunité de gérer environ 30.000 euros pour la mise en place du laboratoire de cultures cellulaires.



Coût total : 331100 euros

Montant en euros TTC		Coûts totaux (euros TTC)				
Nature de la Dépense	Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part	Total
1. Ressources Humaines	Salaire Brut	Charges				
1.1 Doctorant	1757	527,1	36			82227,6
Doctotant (contrat ingénieur d'étude)	1931,6	579,48	3			7533,24
1.2 Encadrant 1 : Directeur de thèse	3977,18	1193	39		40%	80654,8
1.3 Encadrant 2 : Directrice de thèse	5000	1500	39		7%	17745,00
1.4 Autres personnels (hors sous-traitance): Personnel ayant contribué au projet	2587,28	776,18	24		20%	16144,61
Stagiaire	417,09	0	2,5		100%	1042,73
1.5 Sous-traitance: CBM (Centre de Biophysique Moléculaire)			1	3*(18+50)	100%	204,00
Bio-EC			36	592,85	100%	21342,64
Agro-Bio			1	2779,5	100%	2779,5
Sous-total Ressources Humaines						229674,31
2. Consommables						
2.1 Fournitures expérimentales	* voir détails ci-dessus					31228,39
2.2 Fournitures de bureau	matériel: 321,72	impressions papier: 448,9				770,62
2.3 Autres achats						
Sous-total Consommables						31999,01
3. Infrastructures						
3.1 Secrétariat + gestionnaire	Salaire brut: 1612,5	Charges: 483	3		2,5%	157,22
3.2 Locaux (électricité, eau, chauffage, entretien, inter)	Laboratoire: 25000					9000
3.3 Autres						
Sous-total Infrastructures						15881,58
4. Matériel (amortissement)	Taux d'amortissement					
4.1 Matériel expérimentation	47912,9 (voir détails ci-dessus)					47912,9
4.2 Ordinateur + logiciels de bureau	956,8					956,8
4.3 Autres						
Sous-total Matériel						48869,7
5. Déplacement	Transport	Hébergement+ autres frais				
5.1 Missions en France	330,67	15				345,67
5.2 Missions à l'étranger	0	0				
5.3 Congrès en France	160	707,24				867,24
5.4 Congrès à l'étranger	0	0				
Sous-total Déplacements						1212,91
6. Formation						
6.1 Formations						
6.2 Inscription Université	354,57		3			1063,71
Sous-total Formation						1068
7. Documentation et communication						
7.1 Affranchissement	Lettre: 2,8	Lettre +recommandé: 13,08				15,88
7.2 Communications, impressions	Direct: 0	Sous-traitance: 99 + 300				399
7.3 Documentation (périodiques, livres, base de données, bibliothèque,...)	25 euros/ article *voir détails ci-dessus		40 articles			1000
7.4 Autres	Salaire brut: 1612,5	Charges: 483,7	39 mois		1%	817,52
Sous-total Documentation et communication						2232,4
8. Charges financières (intérêt des emprunts)	0					0
Sous-total Charges financières						0
9. Charges exceptionnelles	Frais d'hopitiaux: brut: 5000 + charges: 1500		1		0,5/20	162,5
Sous-total Charges exceptionnelles						162,5
10. TOTAL						331100,31



Les résultats de la thèse :



Résultats pour la science : Au cours de cette thèse au sujet très innovant et à l'interface de nombreuses disciplines (géologie, chimie, biologie, médecine,...), j'ai montré que des molécules de 110 millions d'années étaient encore présentes au sein de mes échantillons. J'ai également prouvé que ces molécules avaient encore une activité sur la peau et l'os. Sur la peau, elles vont permettent de reconstituer une peau neuve parfaitement régulée en 9 jours d'application topique. De plus, cet extrait stimule la production de collagène et d'acide hyaluronique ; 2 actifs anti-âge particulièrement recherchés. Enfin, ces molécules stimulent la régénération osseuse.

Résultats pour l'industrie : ces résultats sont particulièrement prometteurs pour l'industrie cosmétique et pharmaceutique. D'ailleurs, une entreprise dermo-pharmaceutique souhaite valoriser ces résultats et une stagiaire a été recrutée afin de produire l'actif. En parallèle nous avons eu un premier contact avec un des leaders de l'industrie cosmétique français qui réfléchit à une collaboration. Enfin, un brevet et des communications orales et écrites ont également permis de valoriser ces résultats.



Ce que cette conduite de projet m'a apporté : cette expérience fût très formatrice et enrichissante : j'ai pu mener un projet de A à Z et j'ai également eu l'opportunité de manager 1 stagiaire pendant 3 mois. Je me suis aussi adaptée aux diverses situations (professionnelles, relationnelles et conflictuelles). Tout ceci m'a permis de mûrir au niveau professionnel et d'avancer dans ma réflexion de projet professionnel.



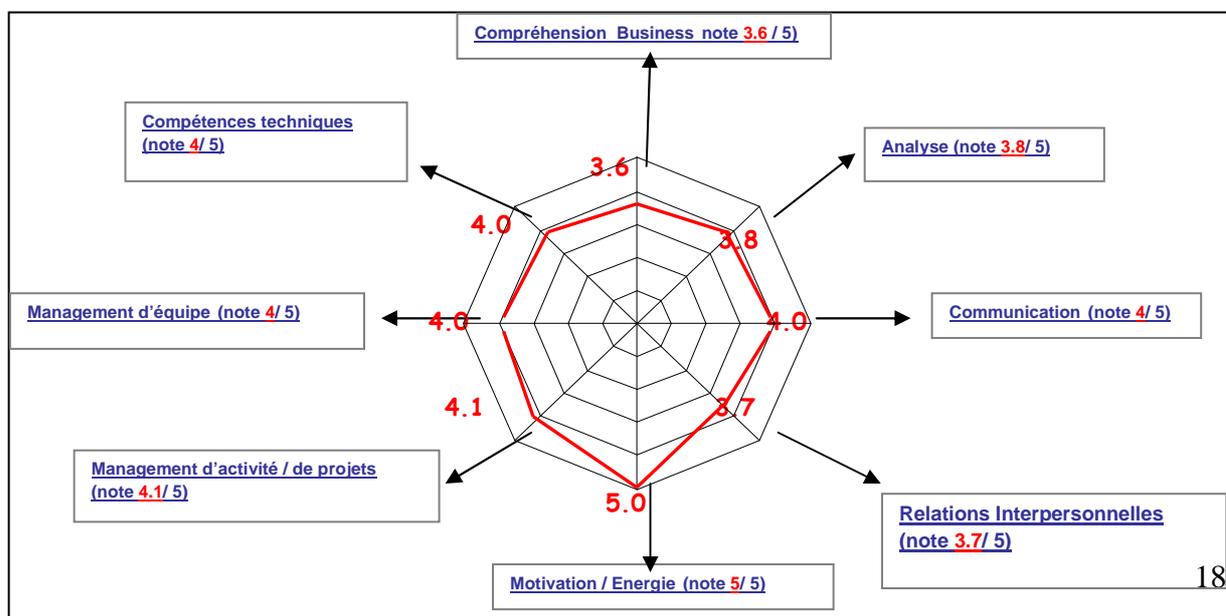
Que puis-je apporter à un futur employeur ?

Mes compétences techniques. . Des savoirs dans le domaine des bioproduits (diplôme d'ingénieur, spécialité « conception et innovation de bio produits »). Des connaissances pointues dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire, via un master (« molecular medicine ») suivi en parallèle de ma dernière année d'école d'ingénieur, un stage de dernière année et mes travaux de thèse. Des compétences également dans les domaines de la biochimie et de la géochimie organique (thèse) et des nombreux outils/ équipements d'analyse associés (HPLC, GC-MS, IR, microscopie...). La maîtrise d'outils tels que le pack MS office, acrobat reader, photoshop. Mes compétences linguistiques concernent avant tout l'anglais que je parle couramment suite à un voyage de 6 mois aux Pays-Bas suivi d'un an en Angleterre et l'espagnol que j'ai appris par moi-même suite à des voyages répétés.

Mon domaine d'expertise scientifique pourrait être défini au sens large comme la recherche de nouveaux principes actifs dans le domaine de la pharmaceutique mais également dans le domaine de la cosmétique. Plus précisément, je me suis intéressée aux principes actifs provenant des minéraux donc des principes actifs naturels/« bio » où j'ai acquis une certaine connaissance. A l'heure où le « bio » est un enjeu principal pour les industries, mes connaissances s'inscrivent donc dans les grandes problématiques actuelles.

Mes savoir-être et savoir-faire : Le diagramme ci-dessous représente mes points forts par famille de compétences. Certaines de ces compétences telles que « Méthode-Rigueur », « Conscience Professionnelle » ou « Enthousiasme » sont des compétences naturelles. Les notes ont été calculées suite à une auto-évaluation de mes compétences.

Auto-évaluation des familles de compétences sur une échelle de 0 à 5 :



Plus en détails :

Capacités d'analyse	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Rigueur ○ Méthode 	<ul style="list-style-type: none"> □ Je suis rigoureuse. Je procède de façon méthodique et avec précision. Lors d'expériences, je commence par planifier et je me mobilise pour le respect des délais. □ Je suis méthodique. Mon esprit très scientifique me permet d'être très organisée, précise et concise dans ce que j'entreprends.
La communication	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Communication orale 	<ul style="list-style-type: none"> □ Je suis à l'aise dans la communication en face à face. J'aime échanger, partager des points de vue (écouter l'autre et exposer mon point de vue). Par exemple, lors de présentation orale, j'ai toujours été félicitée de la clarté des exposés.
Relations interpersonnelles	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Relations Interpersonnelles ○ Leadership ○ Résolution des conflits 	<ul style="list-style-type: none"> □ J'ai un bon contact, j'aime travailler avec les autres de façon constructive. J'ai d'ailleurs encadré une stagiaire dont le stage s'est très bien déroulé que ce soit au niveau scientifique que relationnel. □ Je sais motiver et faire adhérer autour de mes projets. □ Je suis diplomate.
Energie/ Motivation	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Mobilisation pour l'atteinte des objectifs ○ Challenges ○ Enthousiasme 	<ul style="list-style-type: none"> □ J'ai à cœur de mobiliser mon énergie pour atteindre les objectifs fixés (ou que je me suis fixés). Par exemple, à la fin de ma thèse, alors qu'on me conseillait d'arrêter les expériences, j'ai voulu continuer celles-ci afin d'obtenir le plus de résultats possibles quitte à avoir moins de temps pour la rédaction du manuscrit de thèse. □ J'aime relever des nouveaux challenges. Ce fut le cas lors de ma thèse, où le laboratoire pensait que ma thèse ne donnerait pas de résultats et ce ne fut pas le cas bien au contraire. □ Je suis quelqu'un de positif et d'enthousiaste au quotidien. Je vois toujours « la bouteille à moitié pleine » et je pense avoir apporté de la gaieté et une bonne ambiance dans le laboratoire.

Management d'activité	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Sens du résultat ○ Conscience professionnelle ○ Sens du détail 	<ul style="list-style-type: none"> □ Dans le travail et dans mes études, on a souvent dit de moi que je suis professionnelle et consciencieuse. Je respecte les délais, les process, les consignes. □ J'ai besoin d'aller dans le détail pour avoir le sentiment de produire un travail de qualité.
Management d'équipe	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Formation et développement des collaborateurs 	<ul style="list-style-type: none"> □ J'aime transmettre un savoir, permettre à quelqu'un d'apprendre et se développer. Cela a été le cas (déclat pour moi) lors de l'intégration de stagiaires au cours de ma thèse. Une expérience très enrichissante.
Compréhension de mon environnement	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Environnement scientifique 	<ul style="list-style-type: none"> □ Ce travail de thèse m'a permis de m'intéresser à l'environnement scientifique de mon sujet, de prendre contact et de tisser un réseau professionnel. J'ai acquis une bonne vision globale dans mon domaine.

Mon premier point de développement est la gestion du stress : quand la charge de travail est forte, quand je me mets moi-même la pression par volonté de réussir. Dans un premier temps je peux perdre ma concentration, mais mon fort sens du résultat et de l'organisation me permettent rapidement de surmonter et de le gérer. Au final c'est davantage un booster qu'un frein. Cependant, j'ai envie de travailler ce point pour mon bien-être personnel.

Mon deuxième point de développement est l'exigence envers les autres. Je peux mettre la pression sur des points comme le respect des timings, la qualité du travail réalisé ou avoir tendance à faire moi-même pour obtenir un résultat. Il faudrait que j'apprenne à déléguer davantage et faire plus confiance.



Mon projet professionnel

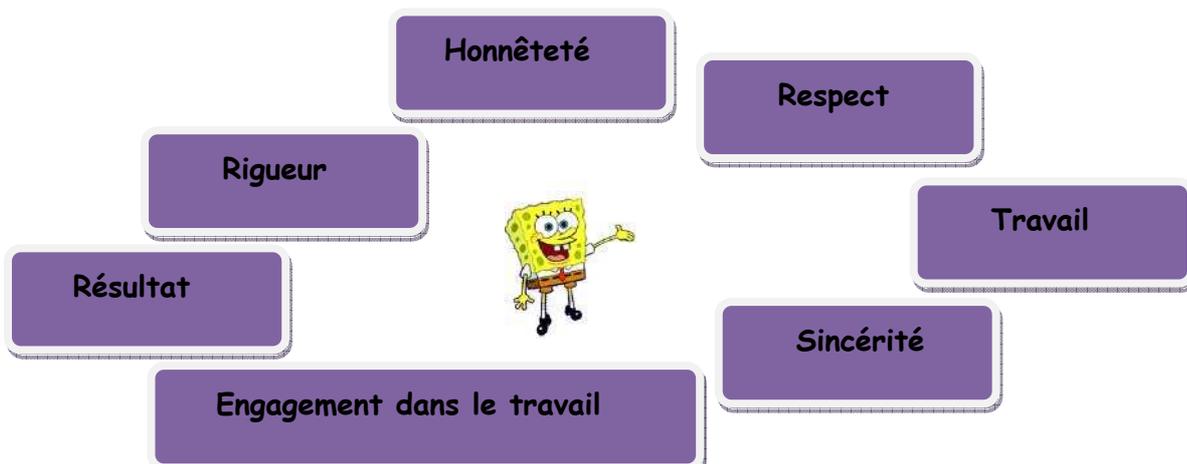
Mes motivations professionnelles : COMPRENDRE & APPRENDRE : un mot me vient à l'esprit, c'est « l'inconnu », les choses qu'on ne comprend pas. J'ai envie de les résoudre. LE CHALLENGE : les défis me motivent, me donnent envie de tout mettre en œuvre pour réussir. Cela me prouve aussi que je suis capable et me fais progresser.

Les actions/ responsabilités qui me caractérisent le mieux dans le travail : COMMUNIQUER: c'est avoir des contacts, une ambiance agréable que ce soit au travail avec les collègues qu'avec des personnes extérieures. GERER: c'est avoir des responsabilités, c'est aussi pour moi avoir de la reconnaissance. DEVELOPPER: c'est rechercher avec des applications directes, apporter des idées nouvelles et donc progresser.

Mes critères de choix professionnels :

- 1- **Un métier en R&D dans l'industrie.** Plusieurs raisons à ce choix du secteur privé : les évolutions possibles, l'orientation « résultats » (dépassement de soi et atteinte des objectifs), des postes à responsabilités (gérer des projets en R&D), et travailler en recherche appliquée (applications directes ce qui est plus motivant).
- 2- **Un environnement où je suis amenée à communiquer** autant en interne qu'en externe. Un métier de contacts où je puisse développer les relations interpersonnelles.
- 3- **Être reconnue dans mon travail** pour mon professionnalisme et ma contribution à faire avancer l'entreprise.
- 4- **Continuer de progresser et d'apprendre** grâce à mon métier.
- 5- **Un équilibre** entre vie professionnelle et vie familiale.

Les valeurs auxquelles je suis attachée sont :



Mes projets professionnels :

Le secteur envisagé : Dans l'idéal, mon secteur d'expertise : la dermo-pharmaceutique. Mais je suis également attirée par la conception et l'innovation de bioproduits dans les secteurs de la cosmétique en général et par la pharmaceutique.

3 métiers envisagés : Par ordre de priorité :

- Chargé de projet R&D
- Ingénieur d'études/ Ingénieur de développement
- Consultante en innovation

Le lieu envisagé : Dans l'idéal, la Cosmetic Valley, pôle de compétitivité majeur au niveau international, c'est un pôle innovant et attractif. Je suis également ouverte à un poste à l'étranger (Etats-Unis, Europe essentiellement).

Les démarches que je vais mettre en œuvre pour entamer ma recherche :

Contacts déjà établis : 2 entreprises de la Cosmetic Valley (l'Oréal et GreenPharma) en parallèle de ma thèse.

Identifications de nouveaux contacts ciblés : prise de contacts des entreprises la Cosmetic Valley via annuaire transmis à l'occasion d'un congrès (identification des entreprises de mes domaines scientifiques et envoi de candidatures spontanées).

Candidatures spontanées : je vais poster mon CV sur le site de la Cosmetic Valley et renouveler cette action régulièrement. Je vais mettre des alertes systématiques sur les offres proposées sur les sites de l'APEC, ABG et autres (par mots clef). Je souhaite également m'inscrire à la Société Française de Cosmétologie afin de me tenir informée des manifestations, innovations et des offres d'emploi. Ma candidature va être transmise chez Dior pendant mon projet NCT.

Pour développer mon réseau : utilisation des réseaux professionnels tels que Viadeo, le Journal du Net, Linked Inn, outils qui m'ont étaient fortement conseillés lors de précédent modules sur la recherche d'emploi. En parallèle, je me suis abonnée à la lettre de l'ABG et à Docteurs & Co, proposés par l'ABG tout ceci afin de me tenir informer des changements et offres dans le monde de l'après doctorat.



Conclusion personnelle

Le Nouveau Chapitre de la Thèse représente pour moi un outil qui m'a donné la possibilité d'expliquer pourquoi j'ai choisi de faire une thèse. Cela m'a permis de faire le point et exposer clairement mes motivations et mes envies en ce qui concerne mon futur emploi. Egalement, j'ai pu d'adapter mon langage dit « académique » pour des personnes non expérimentées. J'en retire un très bon exercice que je conseille très fortement.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour leur présence le jour de ma soutenance.

Ce travail n'aurait pas pu être envisagé sans le financement de l'ANR Nacre et du département du Loiret et du CNRS ainsi que le parrainage de LVMH et plus particulièrement de Patrice André.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Xavier Bourrat pour m'avoir permis de travailler au sein de son équipe sur un sujet passionnant et plein de perspectives prometteuses et également pour la confiance qu'il m'a témoignée, son suivi et ses conseils tout au long de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Madame le Professeur Evelyne Lopez qui a codirigé ce travail, et la remercie pour son dynamisme, ses encouragements et pour les conseils avisés qu'elle a toujours su m'apporter.

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'entreprise Bio-EC, particulièrement à Elian Lati pour son aide et ses suggestions averties.

J'adresse mes sincères remerciements au Centre de Biophysique Moléculaire et plus particulièrement à Madame Martine Cadène et Monsieur Guillaume Gabant pour la collaboration actuellement menée sur le séquençage des protéines de mes échantillons et à l'équipe de Madame Hélène Benedetti pour m'avoir formée sur la technique du SDS-PAGE. Je remercie également Marylène Bertrand pour les tests menés sur la racémisation.

Je tiens également à remercier l'entreprise Omya et avant tout Monsieur Serge Bastiéri, directeur Production et Qualité du site d'Orgon, et Monsieur Sébastien Clauser, géologue en chef d'Omya France pour m'avoir fourni gracieusement les échantillons de ma thèse.

Merci à Madame Pascale Gautret pour son aide apportée dans le domaine de la caractérisation protéique à travers les techniques d'HPLC.

Merci à Monsieur Claude Le Milbeau pour sa disponibilité et ses conseils.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes de l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans pour les bons moments passés ensemble, en particulier Marielle Hatton, Jean Michel Beny, Mohammed Boussafir, Philippe Penhoud, Jeremy Jacob, Olivier Rouer, Sylvain Janiec, Luc Barbansson, Fabien Veillon, Patrick Baillif, Rachel Boscardin, Fatima Laggoun-Defarge, Philippe Teulat, Jean Trichet, Martine Angellier et Jean-Robert Disnar pour l'aide apportée dans les diverses analyses. Je n'oublie pas non plus Marie-Noëlle Pailhès, Chantal Le Coq, Fabienne Le bihan et Nathalie Pothier qui ont toujours été prêtes à me rendre service à la moindre occasion.

Je tiens également à remercier Julie Blachon pour son travail de stage ainsi que Monsieur Christophe Bostyn et Monsieur le Professeur Henri Fauduet pour la conduite efficace de ce projet.

Je remercie chaleureusement mes collègues « thésards » mais avant tout des amis pour moi : Frédéric, Paul, Emmanuelle, Edith, Nour et ceux qui nous ont « quittés » : Amanda, Gerardo, Audrey, Khalifa, Yannouch, Marcio, Mourad... et tous les autres pour avoir partagé avec moi mes joies et mes difficultés, mais également pour leur soutien et les discussions scientifiques que l'on a pu échanger.

Enfin...

Merci à mes amis proches, Clémence et Anne, pour leur soutien et leur amitié qui m'ont beaucoup aidée dans les moments difficiles.

Je remercie plus que chaleureusement ma famille, tout particulièrement mes parents et ma sœur, Mathilde, pour leur écoute et leur soutien. Je les remercie beaucoup de leur patience et de leur aide. Merci pour le soutien apporté.

Merci à Garry ! Merci pour les bons moments passés ensemble, pour ton humour, tes chants et tes danses qui ne cessent de me faire rire. Tu as surtout vécu avec moi les derniers moments de ma thèse mais ton calme et ton soutien ont été très précieux. Merci d'avoir cru en moi !

Je ne pourrais refermer ce chapitre des 3 ans de thèse et de vie à Orléans sans remercier mes amis « Orléanais » : Carotte, Benjo, Cra, Minus, Seb, Nono, Lili, Romain, Carlota, Jeannot, Doud, Nico, Bibou... et le reste de la compagnie du BDZ... Je les remercie pour m'avoir permis de m'évader un peu de la thèse grâce aux bons moments que l'on a pu partager mais également d'avoir supporté mes sautes d'humeur et de m'avoir soutenue...

Références Bibliographiques

- Abelson PH (1954). *"Paleobiochemistry"*, Carnegie Inst., Washington. Yearb. 53: 97-101.
- Abelson PH (1955). *"Organic constituents of fossils"*, Carnegie Washington Yearbook 54: 107-109.
- Addadi L, Joester D, Nudelman F and Weiner S (2006). *"Mollusk Shell Formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes"*, Chem. Eur. J., 12(4): 980-987.
- Al-Aasm IS, Veizer J (1986). *"Diagenetic stabilization of aragonite and low-Mg calcite, I. Trace elements in rudists"*, Journal of sedimentary Petrology, 56(1):138-152.
- Almeida MJ, Milet C, Peduzzi J, Pereira L, Haigle J, Barthélemy M, Lopez E (2000). *"Effect of water-soluble matrix fraction extracted from the nacre of Pinctada maxima on the alkaline phosphatase activity of cultured fibroblasts"*, J. Exp. Zool., 288 (4): 327-334.
- Ambleer RP, Daniel M (1991). *"Proteins and molecular paleontology"*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B, 333(1268): 381-389.
- Armstrong WG, Halstead LB, Reed FB, Wood L (1983). *"Fossil proteins in vertebrate calcified tissues"*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B, 301(1106): 301-343.
- Arnaud-Vanneau A (2007). *"Calcaires, Environnements carbonatés et facteurs écologiques"*, cours Université Joseph Fourier de Grenoble, disponible en ligne: http://www.obs.ujf-grenoble.fr/enseignement/m1_stue/acc_restreint/doc_pedago/TUE404_Ecologie%20M1-404.pdf
- Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC (2007), *"Protein Sequences from Mastodon and Tyrannosaurus Rex Revealed by Mass Spectrometry"*, Science, 316 (5822): 280-285.
- Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E (1997). *"Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration"*, C.R. Acad. Sci. Paris, 320: 253-258.
- Atlan G, Delattre O, Berland S, Le Faou A, Nabias G, Cot D, Lopez E (1999). *"Interface between bone and nacre implants in sheep"*, Biomaterials, 20: 1017-1022.

- Aumailley M and Krieg T (1996). "*Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes*", Journal of Investigative Dermatology, 106(2):209-214.
- Aumailley M and Rousselle P (1999). "*Laminins of the dermo-epidermal junction*", Matrix Biology, 18: 19-28.
- Bada JL, Schroeder RA (1972). "*Racemisation of isoleucine in calcareous marine sediments - Kinetics and mechanism*", Earth and Planetary Science Letters, 15: 1-11.
- Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JCR (1996). "*Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the $\alpha 3$ subunit in hemidesmosome stability and assembly*", J. Cell Sci., 109: 2509-2520.
- Barbet J.P. (1999). "*L'ossification. Polycopie d'histologie, embryologie, cytogénétique*", Laboratoire d'Histologie, Embryologie, Cytogénétique, Faculté de médecine Cochin Port-Royal.
- Barnes M.J (1975). "*Function of ascorbic acid in collagen metabolism* ", Ann. NY Acad. Sci., 258: 264-277.
- Bédouet L, Schuller MJ, Marin F, Milet C, Lopez L, Giraud M (2001). "*Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins*", Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 128: 389-400.
- Bédouet L, Rusconi F, Rousseau M, Duplat D, Marie A, Dubost L, Le Ny K, Berland S, Péduzzi J, Lopez E (2006). "*Identification of low molecular weight molecules as new components of the nacre organic matrix*", Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 144: 532-543.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. (1987). "*Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro*", Endocrinology, 21(6):1985-1992.
- Berridge MJ, Lipp P and Bootman M (1999). "*Calcium signalling*", Curr. Biol., 9(5) : R157-R159.
- Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000). "*The versatility and universality of calcium signalling*", Nat Rev, 1: 11-21.
- Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG and Aubin JE (1988). "*Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells*", Bone, 9(3):155-163.

- Boskey AL (1989). *"Non-collagenous matrix proteins and their role in mineralization"*, Bone Miner., 6:111-123.
- Bourrat X, Francke L, Lopez E, Rousseau M, Stempfle P, Angellier M, Alberic P (2007). *"Nacre biocrystal thermal behaviour"*, CrysEngComm, 9 (12):1205-1208.
- Bourrat X, Lopez E, Rousseau M, « *Obtention et utilisation de principes actifs des calcaires* », dépôt n° 09/01804 en date du 10/04/2009, CTE en cours.
- Bowen R (2003). *"Endocrine control of calcium and phosphate homeostasis"*, disponible en ligne: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/>
- Boyce ST, Supp AP, Swope VB, Warden GD (2002). *"Vitamin C Regulates Keratinocyte Viability, Epidermal Barrier, and Basement Membrane In Vitro, and Reduces Wound Contraction After Grafting of Cultured Skin Substitutes"*, Journal of Investigative Dermatology, 118: 565-572.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW and Sheu SS (2004). *" Calcium, ATP, et ROS: un triangle mitochondrial d'amour-haine "*, J. Cell. Physiol. Am. Physiol., 287: C817-C833.
- Burgeson RE (1993). *"Basement Membranes"*, In: Dermatology in General Medicine (Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds). New York: McGraw-Hill, 329.
- Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO (1993). *"Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million year old weevil"*, Nature, 363: 536-538.
- Cappuccio FP, Kalaitzidis R, Duneclift S, Eastwood JB (2000). *"Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism "*, J. Nephrol., 13(3):169-77. Review.
- Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ (1991). *"Apiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha 3\beta 1$ in epithelial basement membranes"*. Cell, 65: 599-610.
- Chamley H, Masse JP (1975). *"Sur la signification des minéraux argileux dans les sédiments barrémiens et bédouliens de Provence (SE de la France) »*, IX^e Congrès International Sédimentologie, Nice, 1 : 25-29.
- Chang MC, Tanaka J (2002). *"FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde "*, Biomaterials, 23: 4811-4818.

- Chang F, Li G, Haws M, Niu T (2007). "*Element concentrations in shell of Pinctada margaritifera from French Polynesia and evaluation for using as a food supplement*", Food Chemistry, 104: 1171-1176.
- Chateigner D, Ouhenia S, Krauss C, Hedegaard C, Gil O, Morales M, Lutterotti L, Rousseau M, Lopez E (2010). "*Voyaging around Nacre with the X-Ray Shuttle: From Bio-Mineralisation to Prosthetics via Mollusc Phylogeny* ", MSEA, 528: 37-51.
- Clark EA, Brugge JS (1995). "*Integrins and signal-transduction pathways-The road taken* ", Science, 268 (5208): 233-239.
- CoBabe EA, Pratt LM (1995). "*Molecular and isotopic compositions of lipids in bivalve shells: a new prospect for molecular paleontology*", Geochim. Cosmochim. Acta, 59: 87-95.
- Cormier C (2006). "*VitaminD et calcium*", Revue du rhumatisme, 73(8) : 846-851.
- Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L (1989). "*Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization*", J. Invest. Dermatol., 92: 122-125.
- Cubillasa P, Kfherb S, Prieto M, ChaRratb C, Oelkersb EH (2005). "*Experimental determination of the dissolution of rates calcite, aragonite, and bivalves*", Chemical Geology, 216: 59-77.
- Cuif JP, Dauphin Y, Denis A, Gautret P, Kiyashko S, Massault M (1997). "*Factors of early diagenesis in calcareous biominerals: example of a Porites skeleton from New-Caledonia*", Geobios, 30, supplément 1: 171-179.
- Cuif JP, Dauphin Y, Gautret P (1999). "*Compositional diversity of soluble mineralizing matrices in some recent coral skeletons compared to fine-scale growth structures of fibres: discussion of consequences for biomineralization and diagenesis*" International journal of earth sciences, 88 (3): 582 -592.
- Curtis JD, Krinsley D (1965). "*The detection of minor diagenetic alteration in shell material*", Geochim. Cosmochim Acta, 29: 71-84.
- Dale BA, Scofield JAH, Hennings H, Stanley JR, Yuspa SH (1983). "*Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium*", Journal of Investigation Dermatology, 81 (1): S90-S95.
- Dauphin Y (2001). "*Comparative studies of skeletal soluble matrices from some Scleractinian corals and Molluscs International*", Journal of Biological Macromolecules, 28: 293-304.
- Dauphin Y (2002). "*Fossil organic matrices of the Callovian aragonitic ammonites from Lukow (Polland): location and composition*", Int. J. Earth Sci.; 91: 1071-1080.

- Dauphin Y (2006). "*Structure and composition of the septal nacreous layer of Nautilus macromphalus L. (Mollusca, Cephalopoda)*", *Zoology*; 109(2): 85-95.
- Dauphin Y, Denis A (2000). "*Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda*", *Comp. Biochem. Phys. Part A*, 126: 367-377.
- Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K and Hinders S (2000). "*Calcium intake and body weight*", *Journal of Clinical endocrinology and metabolism*, 85: 4635-4638.
- De Vernejoul MC, Marie PJ (1996). "*Cellules osseuses et remodelage osseux*", In : *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte* (Kuntz D., Ed), pp 3-16, Flammarion, Paris.
- Deftos (2002). "*Calcium and phosphate homeostasis*", disponible en ligne: <http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid2/parathyroid2.htm>
- Deng L, Tang X, Chai B (1998). "*Regulatory factors of osteogenic phenotypycal expression by fibroblasts in vitro*", *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Chien Wai Ko Tsa Chih*, 12: 236-240.
- Dissaux A, Bourrat X, Lopez E, Lati E, Gasser P, "*Regulated stimulation of dermis and dermal-epidermal junction of human skin with topical application of calcifying molecules*", to be submitted to *J. of Investigated Dermatology* (in prep).
- Dissaux A., Bourrat X, Gabant G, Cadene M, Gautret P, Lopez E, Trichet J, "*Limestones, a source of proteins and lipids*", to be submitted to *J. of Structural Biology* (in prep).
- Dissaux A., Bourrat X, Lopez E, Lati E, Gasser P, "*Topical activity of calcium on human skin mediated with fossil molecules*", submitted to *Journal of Investigative Dermatology* (in press).
- Dissaux A, Bourrat X, Lopez E, Barbin V, Barbansson L, Beny JM, Masse JP, "*Diagenesis and preservation of biomineralization organic matrix in platform limestones*", to be submitted to *Geochimica and Cosmochimica Acta* (in prep).
- D'Orbigny A (1850). "*Prodrome de paléontologie stratigraphique universelle des animaux mollusques et rayonnés fossiles*", Masson, Paris. 1017 p. (3 vol.).
- Doyle BB (1975). "*Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides*", *Biopolymers*, 14: 937-957.

- Duboeuf F, Braillon P, Chapuy MC, Haond P, Hardouin C, Meary MF, Delmas PD and Meunier PJ (1991). *"Bone mineral density of the hip measured with dual-energy X-ray absorptiometry in normal elderly women and in patients with hip fracture"*, Osteoporos. Int., 1: 242-249.
- Eichner R (1986). *"Epidermal effects of retinoïds: in vivo studies"*, J. Am. Acad. Dermatol., 15(Issue 4, part 2): 789-797.
- Elias PM (1986). *"Epidermal effects of retinoïds: supramolecular observations and clinical implications"*, J. Am. Acad. Dermatol., 15: 797-809.
- Elias PM, Menon GK (1991). *"Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier"*, Adv. Lipid. Res., 24: 1-26.
- Elias PM, Ahn SK, Brown BE, Crumrine D, Feingold KR (2002a). *"Origin of the Epidermal Calcium Gradient: Regulation by barrier Status and Role of Active vs Passive Mechanisms"*, J. Invest. Dermatol., 119: 1269-1274.
- Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK, Komuves L, Lee SH, Feingold KR (2002b). *"Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers"*, Journal of Investigative Dermatology, 119: 1128-1136.
- Epaschalis EP, Betts E, DiCarlo E, Mendelsohn R, Boskey AL (1997). *"FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone"*, Calcif. Tissue Int., 61: 480-486.
- Espitalié J, Deroo G, Marquis F (1985). *"la pyrolyse Rock-Eval et ses applications"*, Revue de l'Institut Français du Pétrole, 40(5) : 563-579, 40(6): 756-784 et 41(1): 74-89.
- Evans AG, Marshall DB (1989). *"The mechanical-behavior of ceramic matrix composites"*, Acta Metallurgica, 37(10): 2567-2583.
- Farre B, Dauphin Y (2009). *"Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha Mollusc shells"*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 152 (2): 103-109.
- Fisher GJ, Voorhees JJ (1996). *"Molecular mechanisms of retinoid actions in skin"*, Faseb J, 10: 1002-1013.
- Flood A, Peters U, Chatterjee N, Lacey Jr JV, Schairer C and Schatzkin A (2005) *"Calcium from Diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women"*, Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 14(1): 126-132.

- Fluhr JW, Vienne MP, Lauze C, Dupuy P, Gehring W, Gloor M (1999). *"Tolerance profile of retinol, retinaldehyde and retinoic acid under maximized and long-term clinical conditions"*, *Dermatology*, 199(suppl 1): 57-60.
- Forslind B, Werner-Linde Y, Lindberg M, Pallon J (1999). *"Elemental analysis mirrors epidermal differentiation"*, *Acta Derm. Venereol. (Stockh)*, 79: 12-17.
- Franceschi RT (1992). *"The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation"*, *Nutr. Rev.* 50: 65-70.
- Franceschi RT, Iyer BS (1992). *"Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-El cells"*, *J. Bone Miner. Res.*, 7: 235-246.
- Franceschi RT, Iyer BS, Cui Y (1994). *"Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-El cells"*, *J. Bone Miner. Res.* 9: 843-854.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987). *"Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers"*, *Cell Tissue Kinet*, 20: 263-272.
- Fuchs E (1990). *"Epidermal Differentiation - The Bare Essential"*, *Journal of Cell Biology*, 111(6): 2807-2814.
- Gautret P (2000). *"Intraskelatal organic matrices from reefal scleractinian corals: early diagenetic transformations of biochemical characters and consequences for cementing processes"*, *Geobios*, 33 (1): 73-78.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). *"Transduction-Integrin signaling"*, *Science*, 285 (5430): 1028-1032.
- Gili E, Masse JP, Skelton PW (1995). *"Rudists as gregarious sediment-dwellers, not reef-builders, on Cretaceous carbonate platforms"*, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 118: 245-267.
- Gregoire C (1959). *"A study on the remains of organic components in fossil mother of pearl"*, *Bull. Inst. R. Sci. nat. Belg.*, 35(13): 1-14.
- Gregoire C (1966). *"Experimental diagenesis of the Nautilus shell"*, In: *advances in Organic Geochemistry*, JD Hobson and GC Speers, Editors.
- Gregoire C (1970). *"Proteins in shells of fossil cephalopods (Nautiloids and ammonoids) and experimental simulation of their alterations"*, *Archives Internationales de physiologie et de biochimie*, 78: 191-203.

- Griffin RC, Chamberlain AT, Hotz G, Penkman KEH, Collins MJ (2009). "*Age Estimation of Archaeological Remains Using Amino Acid Racemization in Dental Enamel: A Comparison of Morphological, Biochemical, and Known Ages-At-Death*", American Journal of Physical Anthropology, 140 (2): 244-252.
- Hall A, Kennedy WJ (1967). "*Aragonite in fossils*", Proc. Roy. Soc. B, 168: 377-412.
- Hara M, Kikuchi K, Watanabe M, Denda H, Koyama J, Horii I, Tagami H (1993). "*Senile xerosis: Functional, morphological and biochemical studies*", Journal of Geriatric Dermatology, 1: 111-120.
- Hare PE, Von Endt DW, Kokis JE (2002). "*Protein and Amino Acid Diagenesis Dating*", In Chronometric Dating in Archeology, Taylor & Aitken ed, Plenum.
- Hautmann M (2006). "*Shell mineralogical trends in epifaunal Mesozoic bivalves and their relationship to seawater chemistry and atmospheric carbon dioxide concentration*", Facies, 52: 417-433.
- Heaney RP (2003). "*How does bone support calcium homeostasis?*", Bone, 33(3): 264-268.
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980). "*Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture*", Cell, 19(1): 245-254.
- Henthorn PS (1996). "*Alkaline Phosphatase*", In: Principles of bone biology. (Bilezikian J.P, Raisz L.G, Rodan G.A, Eds), p197-206; San Diego: Academic Press.
- Higuchi R, Bowman B, Freiburger M, Ryder A, Wilson AC (1984). "*DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*", Nature, 312: 282-284.
- Hill PA (1998). "*Bone remodelling*", Br J Orthod, 25: 101-107.
- Hottinger L (1984). « *Les organismes constructeurs sur la plateforme du golfe d'Aqaba (Mer Rouge) et les mecanismes régissant leur répartition* », Geobios (Lyon), 8: 241-249.
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K (1993). "*Type IV collagen: structures, gene organization and role in human diseases*", J. Biol. Chem., 268: 26033-26036.
- Huq NL, Rambaud SM, Teh LC, Davies AD, McCulloch B, Trotter MM, Chapman GE (1985). "*Immunochemical detection and characterization of osteocalcin from Moa bone*", Biochem. Biophys. Res. Com., 129: 714-720.
- Ingalls AE, Lee C, Druffel ERM (2003). "*Preservation of organic matter in mound-forming coral skeletons*", Geochimica and Cosmochimica Acta, 67(15):2827-2841.

- Jackson AP, Vincent JFV, Turner RM (1988). "*The Mechanical Design of Nacre*", Proc. R. Soc. London Ser. B, 234 (1277): 415-440.
- Jones H, Blanc D, Cunliffe WJ (1980). "*13-cis retinoic acid and acne*", The Lancet 316 (8203): 1048-1049.
- Kanitakis J (1995). "*Structure histologique de la peau humaine*". In : Biologie de la peau humaine : Schmidt D. Les éditions INSERM 1-20.
- Kass-Wolff JH (2004). "*Calcium in women: Healthy Bones and much more*", Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing, 33: 21-33.
- Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J (1991). "*Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype*", J. Cell. Physiol., 147: 111-120.
- Kaya G (2008). "*Dermatoporose: un syndrome émergent*", Revue Médicale Suisse, 155.
- Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Vassalli P, Stamenkovic I (1997). "*Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation*", Genes Dev., 11(8): 996-1007.
- Kelly GS (1999). "*Squalene and Its Potential Clinical Uses*", Alternative medicine review, 4(1): 29-36.
- Laemmli UK (1970). "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*", Nature, 227(259): 680-685.
- Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Huet H, Laurent A, Milet C and Lopez E (1999). "*Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies*", Bone, 15(2): 91S-94S.
- Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies K.M, Recker RR and Heaney R (2007). "*Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial*", the American Journal of Clinical Nutrition 85: 1586-1591.
- Laurent TC and Fraser JRE (1992). "*Hyaluronan*", The FASEB Journal 6(7): 2397-2404.
- Le Faou A (1996). "*Processus d'ostéoinduction généré par la nacre : mise en évidence et régulation in vivo*". Thèse pour le doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, spécialité : Physiologie, Endocrinologie.

- Le Panse R, Bouchard B, Lebreton C, Coulomb B (1996). "*Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix*", Exp. Dermatol. 5: 108-114.
- Lefur A, Arnaud JP (2004). "*Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques*", OCL 11(6): 436-439.
- Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L, Weiner S (2001). "*Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM*", J. Struct. Bio., 135: 8-17.
- Lewis RS, Cahalan MD (1995). "*Potassium and Calcium Channels in Lymphocytes*", Annual Review of Immunology, 13: 623-653.
- Lian JB, Stein GS (1995). "*Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation*", Iowa Orthop J., 15: 118-140.
- Lian JB, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AL (1999). "*Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process*", In: Primer on the metabolic bone diseases of mineral metabolism (Favus M.J, Ed.), p16-24; Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Lin J, Manson JE, Lee I-Min, Cook NR, Buring JE, Zhang SM (2007). "*Intakes of Calcium and Vitamin D and Breast Cancer Risk in Women*", Arch Intern Med 167: 1050-1059.
- Lips P (2001). "*Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications*", Endocr Rev 22: 477-501.
- Lopez E, Vidal B, Berland S, Camprasse C, Camprasse G, Silve C (1992). "*Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro*", Tissue Cell, 24: 667-679.
- Lopez E, Le Faou A, Borzeix S, Berland S (2000). "*Stimulation of rat cutaneous fibroblasts and their synthetic activity by implants of powdered nacre (mother of pearl)*", Tissue & Cell, 32(1): 95-101.
- Lopez E, Giraud M, Berland S, Milet C, Gutierrez G (2001). "*Method of preparing active substances from nacre, products obtained which can be used in particular as medicaments*", dépôt n°09/091,989 en date du 27/12/96.
- Lopez E, Lati E, Gasser P, Rousseau M (2008a). "*Calcium improves skin health*", Household and Personal Care Today, n°3.

- Lopez E, Rousseau M, Bourrat X (2008b). "*Mother-of-pearl, biomineralization and their materia medica*". Biofutur, 291(27): 53-56.
- Machhour L, Masse JP, Oudin JL, Lambert B, Lapointe P (1998). "*Petroleum potential of dysaerobic carbonate source rocks in an intra-shelf basin: The Lower Cretaceous of Provence, France*", Petroleum Geoscience, 4(2): 139-146.
- Mägert HJ, Ständker L, Kreutzmann P, Zucht HD, Reinecke M, Sommerhoff CP, Fritz H, Forssmann WG (1999). "*LEKTI, a Novel 15-Domain Type of Human Serine Proteinase Inhibitor*", The Journal of Biological Chemistry, 274(31): 21499-21502.
- Mahan LK and Escott-Stump S (1996). "*Minerals*", In: Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy, 9th edition, Philadelphia, PA. WB. Saunders Company, 124-130.
- Major GC, Alarie F, Dore J, Phouttama S, Tremblay A (2007). "*Supplementation with calcium + vitamin D enhances the beneficial effect of weight loss on plasma lipid and lipoprotein concentrations*", Am J Clin Nutr., 85(1):54-59.
- Malmquist KC, Carlson LE, Forslind B, Roomans GM, Akselsson DR (1984). "*Proton and electron microprobe analysis of human skin*", Nuclear Instruments and Methods in Physic. Research, 3: 611-617.
- Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher A (1988) "*Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats*", Cell Tissue Res., 254: 317-330.
- Mann S (2001). "*Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*", Oxford University Press.
- Marin F, Pereira L, Westbroek P (2001). "*Large-scale purification of molluscan shell matrix*", Prot. Expres. Purif., 23: 175-179.
- Marin F, De Groot K, Westbroek P (2003). "*Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies*", Prot. Expr. Purif. 30: 246-252.
- Marin F, Luquet G (2004). "*Molluscan shell proteins*", C. R. Palevol., 3 (6-7): 469-492.
- Marin F, Pokroy B, Luquet G, Layrolle P, De Groot K (2007). "*Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold*", Biomater., 28: 2368-2377.
- Marinkovich P, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE (1993). "*Cellular Origin of the Dermal-Epidermal Basement Membrane*", Developmental Dynamics, 197: 255-267.
- Marionnet C, Vioux-Chagnoleau C, Pierrard C, Sok J, Asselineau D, Bernerd F (2006). "*Morphogenesis of dermal-epidermal junction in a model of reconstructed skin: beneficial effects of vitamin C*", Experimental Dermatology, 15: 625-633.

- Masse JP (1976). *"Les calcaires urgoniens de Provence (Valanginien-Aptien inférieur). Stratigraphie, paléontologie, les paléoenvironnements et leur évolution"*, Thèse Sci. Marseille, 445p, 60pl.
- Masse JP (1993) *"Valangian-Early Aptian Carbonate Platforms from Provence, Southeastern France"*, In: Simo T., Scott R.W., Masse J.P. (eds). *Cretaceous Carbonate Platforms: American Association of Petroleum Geologists, Memoire 56*, pp. 363-373.
- Masse JP (1995). *"Rudists as gregarious sediment-dwellers, not reef-builders, on Cretaceous carbonate platforms"*, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 118: 245-267.
- Masse JP, Philip J (1972). *"Observation sur la croissance et l'ontogenèse du test des radiolitidae (Rudistes)"*, *C.R. Acad. Sc. Paris*, 274 : 3202-3205.
- Masse JP, Philip J (1976). *"Paléogéographie et tectonique du Crétacé moyen en Provence : révision du concept d'isthme durancien"*, *Rev de Géogr. Physiq. Et Géol. Dynam.* 2, 18(1): 49-66.
- Masse JP, Philip J (1981). *"Cretaceous coral-rudist buildups of France"*. In: Toomey, D.F. (Ed.), *European Fossil Reef Models. SEPM Spec. Publ. 30*, pp. 399-426.
- Masse JP, Fenerci-Masse M (2006). *"Carbonate production by rudist bivalves. The record of Late Barremian Requieniid communities from Provence (SE France)"*, *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*; 234(2-4): 239-257.
- Masunaga T, Shimizu H, Ishiko A, Tomita Y, Aberdam D, Ortonne JP, Nishikawa T (1996). *"Localization of Laminin-5 in the epidermal basement membrane"*, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44 (11): 1223-1230.
- Matter P, Davidson FD, Wyckoff RWG (1969). *"The composition of fossil oyster shell proteins"*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 64: 970-972.
- Meaume S, Téot L, Dereure O (2005). *"Plaies et Cicatrisations"*, Masson.
- Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, Lichti U, Bisher ME, Steven AC, Steinert PM, Yuspa SH and Roop DR (1990). *"Identification of a major keratinocyte cell-envelope protein, loricrin"*, *Cell*, 61 (6): 1103-1112.
- Menon GK, Grayson S, Elias PM (1985). *"Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry"*, *J. Invest Dermatol.*, 74: 508-512.
- Menon GK, Elias PM (1991). *"Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis"*, *Arch. Dermatol.* 127: 57-63.

- Menon GK, Price LF, Bommannan B, Elias PM, Feingold KR (1994). "*Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhance lamellar body secretion*", J. Invest. Dermatol., 102: 789-795.
- Meyer K, Palmer JW (1934). "*The polysaccharide of the vitreous humor*", J. Biol. Chem., 107: 629-634.
- Milet C, Berland S, Lamghari M, Mouries L, Jolly C, Borzeix S, Doumenc D, Lopez E (2004). "*Conservation of signal molecules involved in biomineralisation control in calcifying matrices of bone and shell*", Comptes Rendus. Paléovol., 3(6-7): 493-501.
- Mitterer RM (1968). "*Amino acid composition of organic matrix in calcareous oolites*", Science, 162(3861): 1498-1499.
- Mitterer RM and Cunningham R Jr (1985). "*The interaction of natural organic matter with grain surfaces: implications for calcium carbonate precipitation*", In: N. Schneidermann and P. Harris, Editors, Carbonate Cements, Soc. Econ. Pal. Miner., 36: 17-33.
- Morse JW, Zullig JJ, Bernstein LD, Millero FJ, Milne P, Mucci A, Choppin GR, (1985). "*Chemistry of calcium carbonate rich shallow-water sediments in Bahama*", American Journal of Science; 285: 147-185.
- Morvan JR (2009). "*Composition cométique et/ou dermopharmaceutique et/ou alimentaire renfermant un mélange d'éléments minéraux naturels et leurs utilisations*", dépôt n° 07/05322 en date du 23/07/07.
- Nanchahal J, Riches D.J (1991). "*Ultrastructural localization of anionic sites at the dermo-epidermal junction in normal human skin*", J. Anat., 176: 181-195.
- Nefussi JR, Boy-Lefèvre ML, Boulekbache H, Forest N (1985). "*Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion*", Differentiation, 29: 160-168.
- Nefussi JR, Septier D, Collin P, Goldberg M, Forest N (1989). "*A comparative ultrahistochemical study of glycosaminoglycans with cuprolinic blue in bone formed in vivo and in vitro*", Calcif. Tissue Int., 44: 11-19.
- Nefussi JR, Sautier JM, Forest N (1993). "*Modèle de culture et concept de surface osseux*", C. R. Soc. Biol., 187:1-13.
- Nefussi JR, Bramia G, Modrowskib D, Oboeufa M and Foresta N (1997). "*Sequential Expression of Bone Matrix Proteins during Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro*", Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45: 493-504.

- Nemes Z, Steinert PM (1999). *"Bricks and mortar of the epidermal barrier"*, Experimental and Molecular Medicine, 31: 5-19.
- Neuweiler F, Gautret P, Thiel V, Lange R, Michaelis W, Reitner J (1999). *"Petrology of Lower Cretaceous carbonate mud mounds (Albian, N-Spain): insights into organomineralic deposits of the geological record"*, Sedimentology; 46 (5): 837-859.
- Nieves JW (2005). *"Osteoporosis: the role of micronutrients"*, Am. J. Clin. Nutr., 81 (supp 1): 1232S-1239S.
- Organ CL, Schweitzer MH, Zheng W, Freimark LM, Cantley LC, Asara JM (2008). *"Molecular Phylogenetics of Mastodon and Tyrannosaurus rex »*, Science, 320(5875): 499.
- Owen ME, Friedenstein AJ (1988). *"Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors"*, Ciba Found. Symp., 136: 42-54.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilning L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990). *"Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In Vitro: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation during Formation of the Bone Extracellular Matrix"*, J. Cell. Physiol., 143: 420-430.
- Pääbo S (1985). *"Molecular-cloning of ancient Egyptian mummy DNA"*, Nature, 314: 644-645.
- Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989). *"Ancient DNA and polymerase chain-reaction- The emerging field of molecular archaeology"*, Journal of Biological Chemistry, 264 (17): 9709-9712.
- Payne KJ, Veis A (1988). *"Fourier Transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies"*, Biopolymers, 27: 1749-1760.
- Pereira-Mouries L (2003). *"Etude des composants de la matrice organique hydrosoluble de la nacre de l'huître perlière Pinctada Maxima. Bioactivité dans le processus de régénération osseuse"*, Thèse Biologie et Biochimie appliquées, 163 pages.
- Perrin C (2004). *"Early diagenesis of carbonate biocrystals: isomineralogical changes in aragonite coral skeletons"*, Bulletin de la société géologique de France, 175 (2): 95-106.
- Perrin C, Smith DC (2007). *"Decay of skeletal organic matrices and early diagenesis in coral skeletons"*, C. R. Palevol, 6: 253-260.

- Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000). *"Tissue-engineered bone regeneration"*, Nat. Biotechnol., 18 (9): 959-963.
- Philip J (1970). *"Les formations calcaires à rudistes du Crétacé supérieur provençal et rhodanien"*, Thèse Sci. Nat., Marseille, 438p.
- Prince RL, Devine A, Dhaliwal SS, Dick IM (2006). *"Effects of Calcium Supplementation on Clinical Fracture and Bone Structure"*, Arch. Intern. Med., 166: 869-875.
- Prost-Squarcioni C, Heller M, en collaboration avec Sylvie Fraitag (2005). *"Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes"*, Ann. Dermatol. Venereol., 132: 8S5- 8S48. Structure de la peau.
- Racioppi L, Means AR (2008). *"Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller"*, Trends in Immunology, 29 (12): 600-607.
- Raisz LG (2005). *"Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects"*, J. Clin. Invest., 115(12):3318-3325.
- Ramseyer K, Miano TM, DOrazio V, Wildberger A, Wagner T, Geister J (1997). *"Nature and origin of organic matter in carbonates from speleothems, marine cements and coral skeletons"*, Organic Geochemistry, 26(5-6): 361-378.
- Rat P, Pascal A (1979). *"From the Urgonian stage to the Urgonian biosedimentary systems"*, Geobios, mémoire spécial 3: 385-399.
- Rat P, Pascal A (1982). *"Les plates-formes carbonatées à rudistes (dites urgoniennes) du Crétacé Inférieur et leur environnement"*, Cretaceous Research, 3 : 155-166.
- Reddi AH et Huggins CB (1972). *"Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats"*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 1601-1605.
- Repellin P, Trichet J (1975). *"Un exemple de diagénèse de carbonates récifaux (Atoll de Mururoa, Polynésie française)"*, In: 9th International Congress of Sedimentology, Nice, Topic 7. Proceedings: 179-186, 3 pl.
- Riding R (2002). *"Structure and composition of organic reefs and carbonate mud mounds: concepts and categories"*, Earth-Science Reviews, 58(1-2): 163-231.
- Rosch R, Klinge U, Si Z, Junge K, Klosterhalfen B, Schumpelick V (2002). *"A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia?"*, BMC Med. Genet., 3: 2.

- Rosenthal DS, Griffiths CEM, Yuspa SH, Roop DR, Voorhees JJ (1992). "*Acute or chronic topical retinoic acid treatment of human skin in vivo alters the expression of epidermal transglutaminase, loricrin, involucrin, filaggrin and keratins 6 and 13 but not keratins 1, 10 and 14*", *Journal of Investigative Dermatology*, 98: 343-350.
- Roskelley CD, Bissell MJ (1995). "*Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function*", *Biochem Cell Biol.*, 73: 391–397.
- Ross DJ, Skelton PW (1993). "*Rudist formations of the Cretaceous: a palaeoecological, sedimentological and stratigraphic review*". In: Wright P., ed, *Sedimentology Review*, vol.1, Blackwell, London: 73-91.
- Rousseau M, Pereira-Mouries L, Almeida MJ, Milet C, Lopez E (2003). "*The water-soluble matrix fraction from the nacre of Pinctada maxima produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 135: 1-7.
- Rousseau M, Lopez E, Coute A, Mascarel G, Smith DC, Naslain RR, Bourrat X (2004). "*Multi-scale structure and growth of nacre: a new model for bioceramics*", 16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Porto PORTUGAL, *BIOCERAMICS*, 16(254-2): 1009-1012.
- Rousseau M, Lopez E, Stempfle P, Brendle M, Franke L, Guette A, Naslain R, Bourrat X (2005). "*Multiscale structure of sheet nacre*", *Biomaterials*, 26(31): 6254-6262.
- Rousseau M, Bedouet L, Lati E, Gasser P, Le Ny K, Lopez E (2006). "*Restoration of stratum corneum with nacre lipids*", *Comparative Biochemistry and Physiology, PartB*, 145: 1-9.
- Rousseau M, Meibom A, Geze M, Bourrat X, Angellier M, Lopez E (2009). "*Dynamics of sheet nacre formation in bivalves*", *Journal of Structural Biology*, 165(3): 190-195.
- Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE (1991). "*Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments*", *J. Cell Biol.* 114: 567-576.
- Rousselle P, Douglas RK, Ruggiero F, Champlaud MF, Van der Rest M and Burgeson RE (1997). "*Laminin 5 Binds the NC-1 Domain of Type VII Collagen*", *The Journal of Cell Biology* 138(3): 719-728.

- Ruzzi L, Gagnoux-Palacios L, Pinola M, Belli S, Meneguzzi G, D'Alessio M et al. (1997). «*A homozygous mutation in the integrin $\alpha 6$ gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia* », J. Clin. Invest., 99: 2826-2831.
- Sandberg PA, Hudson JD (1983). "*Aragonite relic preservation in Jurassic calcite-replaced bivalves*", Sedimentology, 30(6): 879-892.
- Santos Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca-Sanchez E, Julian-Gonzalez R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernandez JJ, Bullón-Sopelana A (2006). "*E-Cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma*", Oral Medicine and Pathology, 11: E100-105.
- Scholzen T, Gerdes J (2000). "*The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown*", Journal of Cellular Physiology, 182(3): 311-322.
- Shen X, Belcher AM, Hansma PK, Stucky GD, Morse DE (1997). "*Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens**", J. Biol. Chem., 272: 32472-32481.
- Skelton PW (1976). "*Functional morphology of the Hippuritidae*", Lethaia, 9: 83-100.
- Somer E (1995). "*Minerals*", In: The Essential Guide to Vitamins and Minerals, New York: Harper Perennial: 89-94.
- Sonju Clasen AB, Ruyter IE (1997). "*Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transformation infrared spectroscopy*", Adv. Dent. Res., 11:523-527.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA (1990). "*Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation*", FASEB J., 4: 3111-3123.
- Steuber T (1996). "*Stable isotope sclerochronology of rudist bivalves: growth rates and late Cretaceous seasonality*", Geology, 24: 314-318.
- Steuber T (1999). "*Isotopic and chemical intra-shell variations in low-Mg calcite of rudist bivalves (Mollusca-Hippuritacea): disequilibrium fractionations and late Cretaceous seasonality*", Int Journ Earth Sciences, 88: 551-570.
- Steuber T (2000). "*Skeletal growth rates of Upper Cretaceous rudist bivalves: implications for carbonate production and organism-environment feedbacks*", In; Skelton PW, Insalaco E, Palmer TJ (Eds). Carbonate Platform Systems: Components and Interactions. Geol. Soc., London, Spec. Publ. 178: 21-32.

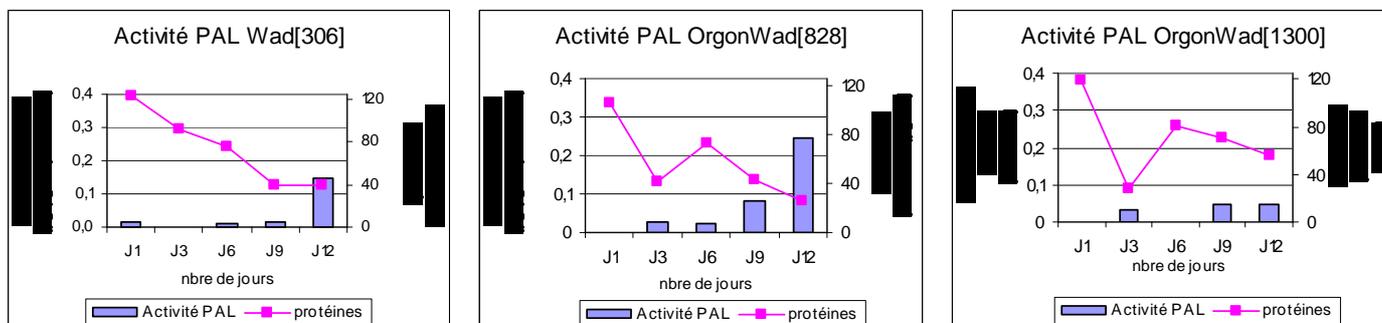
- Steuber T, Rauch M (2005). *"Evolution of the Mg/Ca ratio of Cretaceous seawater - Implications from the composition of biological low-Mg calcite"*, Marine Geology, 217: 199-213.
- Stolarski J, Gorzelak P, Mazur M, Marrocchi Y, Meibom A (2009). *"Nanostructural and geochemical features of the Jurassic isocrinid columnal ossicles"*, Acta Palaeontologica Polonica, 54 (1): 69-75.
- Storey WF, Leblond CP (1951). *"Measurement of the rate of proliferation of epidermis and associated structures"*, Annals of the New York Academy of Sciences, 53: 537-545.
- Syed F, Khosla S (2005). *"Mechanisms of sex steroid effects on bone"*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 328(3): 688-696.
- Sykes GA, Collins MJ, Walton DI (1995). *"The significance of a geochemically isolated intracrystalline organic fraction within biominerals"*, Org. Geochem., 23 (11-12): 1059-1065.
- Timpl R (1996). *"Macromolecular organization of basement membranes"*, Curr. Opin. Cell Biol., 8: 618-624.
- Timpl R, Rhodes H, Robey P, Rennard S, Foidart JM, Martin GR (1979). *"Laminin, a glycoprotein from basement membranes"*, J. Biol. Chem., 254: 9933-9937.
- Timpl R, Dziadek M (1986). *"Structure, Development and Molecules pathology of basement membranes"*, Int. Rev. Exp. Pathol, 29: 1-112.
- Trichet J (1968). *"Etude de la composition de la fraction organique des oolithes. Comparaison avec celle des membranes des bactéries et des cyanophycées »*, C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, 267: 1492-1494.
- Trichet J, Défarge C (1995). *"Non-biologically supported Organomineralization"*, Bull. Inst. Oceanogr. De Monaco, n° special, 14(2): 203-236.
- Van der Rest M, Aubert-Foucher E, Dublet B, Eichenberger D, Font B, Goldschmidt D (1991). *"Structure and function of the fibril-associated collagens"*, Biochem. Soc. Trans., 19(4): 820-824.
- Veizer J, Ala D, Azmy K, Bruckschen P, Buhl D, Bruhn F, Carden GAF, Diener A, Ebneh S, Godderis Y, Jasper T, Korte C, Pawellek F, Podlaha OG, Strauss H (1999). *"Sr87/Sr86, C13, and O18 evolution of Phanerozoic seawater"*, Chemical Geology 161: 59-88.

- Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruckner-Tuderman L, Hansen U, Bruckner P (2008). "Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone", *J. Biol. Chem.*, 283 (36): 24506-24513.
- Virtanen M, Törmä H, Vahlquist A (2000). "Keratin 4 upregulation by retinoic acid in vivo: A sensitive marker for retinoid bioactivity in human epidermis", *Journal of Investigative Dermatology*, 114 (3): 487-493.
- Voss-Foucart MF (1968). "Paleoproteins of fossil dinosaur egg shells found in upper Cretaceous level in Provence", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 24 (1): 31-32.
- Vuola J, Böhling T, Göransson H, Puolakkainen P (2002). "Transforming growth factor *b* released from natural coral implant enhances bone growth at calvarium of mature rat", *Journal of Biomedical Materials Research*, 59 (1): 152-159.
- Walser M (1961). "Ion association.VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma", *J. Clin. Invest.*, 40: 723-730.
- Watanabe R, Wu K, Paul P, Marks DL, Kobayashi T, Pittelkow MR, Pagano RE (1998). "Up-regulation of glycosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation", *J. Biol. Chem.*, 273: 9651-9655.
- Watt FM (1989). "Terminal differentiation of epidermal keratinocytes", *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1: 1107-1115.
- Weiner S, Lowenstam HA, Hood L (1976). "Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(8): 2541-2545.
- Weiner S, Lowenstam HA, Hood L (1977). "Discrete molecular weight components of the organic matrices of molluscan shells", *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30: 45-51.
- Weiner S, Lowenstam HA, Taborek B, Hood L (1979). "Fossil mollusk shell organic matrix components preserved for 80 million years", *Paleobiology*, 5(2): 144-150.
- Weiner S, Lowenstam HA (1980). "Well-preserved fossil mollusk shells: characterization of mild diagenetic processes", In: *Biogeochem. Amino Acids*, Hare, P. E., Hoering, T. C., and King, K., New York, John Wiley & Sons. Pap. Conf., 95-114.
- Weiner S, Traub W (1984). "Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. B.* 304: 425-434.
- Westbroek P, Marin F (1998). "A marriage of bone and nacre", *Nature*, 392 (6679): 861-862.

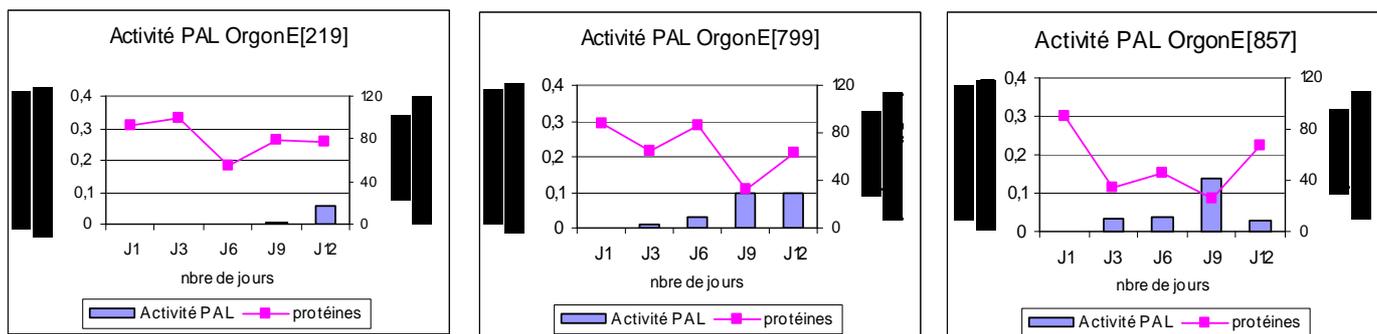
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988). "*Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*", Science, 242 (4885): 1528-1534.
- Yancey KB (1995). "*Adhesion Molecules. II: Interactions of Keratinocytes with Epidermal Basement Membrane*", Journal of Investigative Dermatology, 104: 1008-1014.
- Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR (1989). "*Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro*", J. Cell. Biol., 109(3): 1207-1217.

Annexes

Annexe 1. Evolution au cours du temps de l'activité PAL et de la quantité de protéines des fibroblastes, MRC-5.

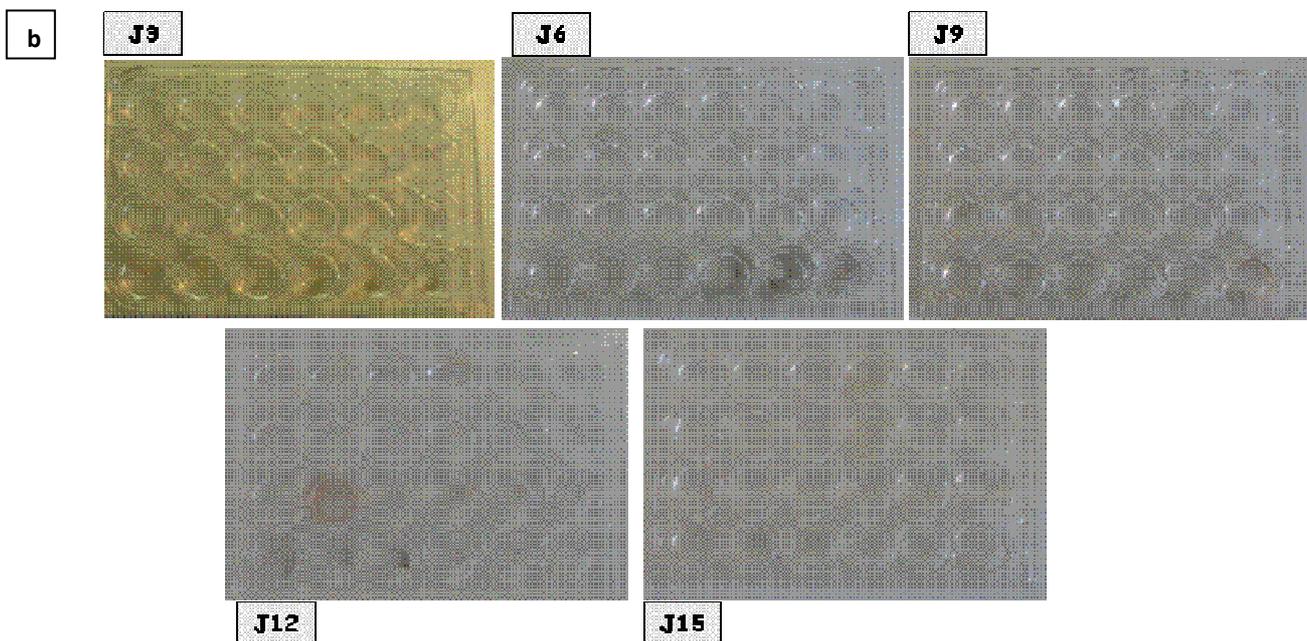
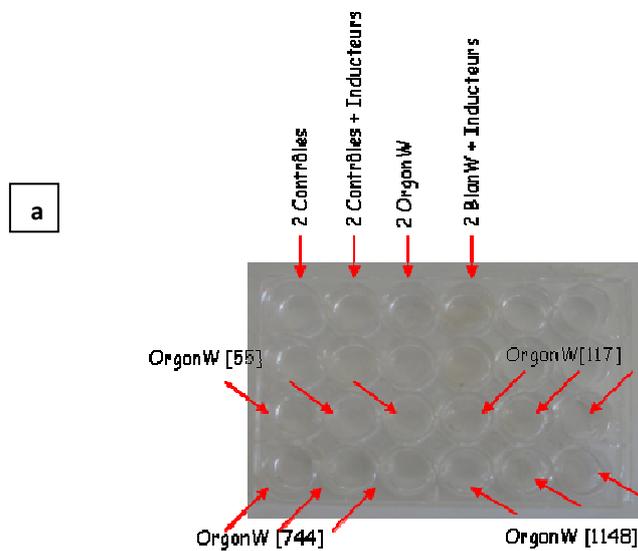


Annexe 1a. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse à l'extrait OrgonWad à 306µg de protéines/ml (a), 828µg de protéines/ml (b) et 1300µg de protéines/ml (c).

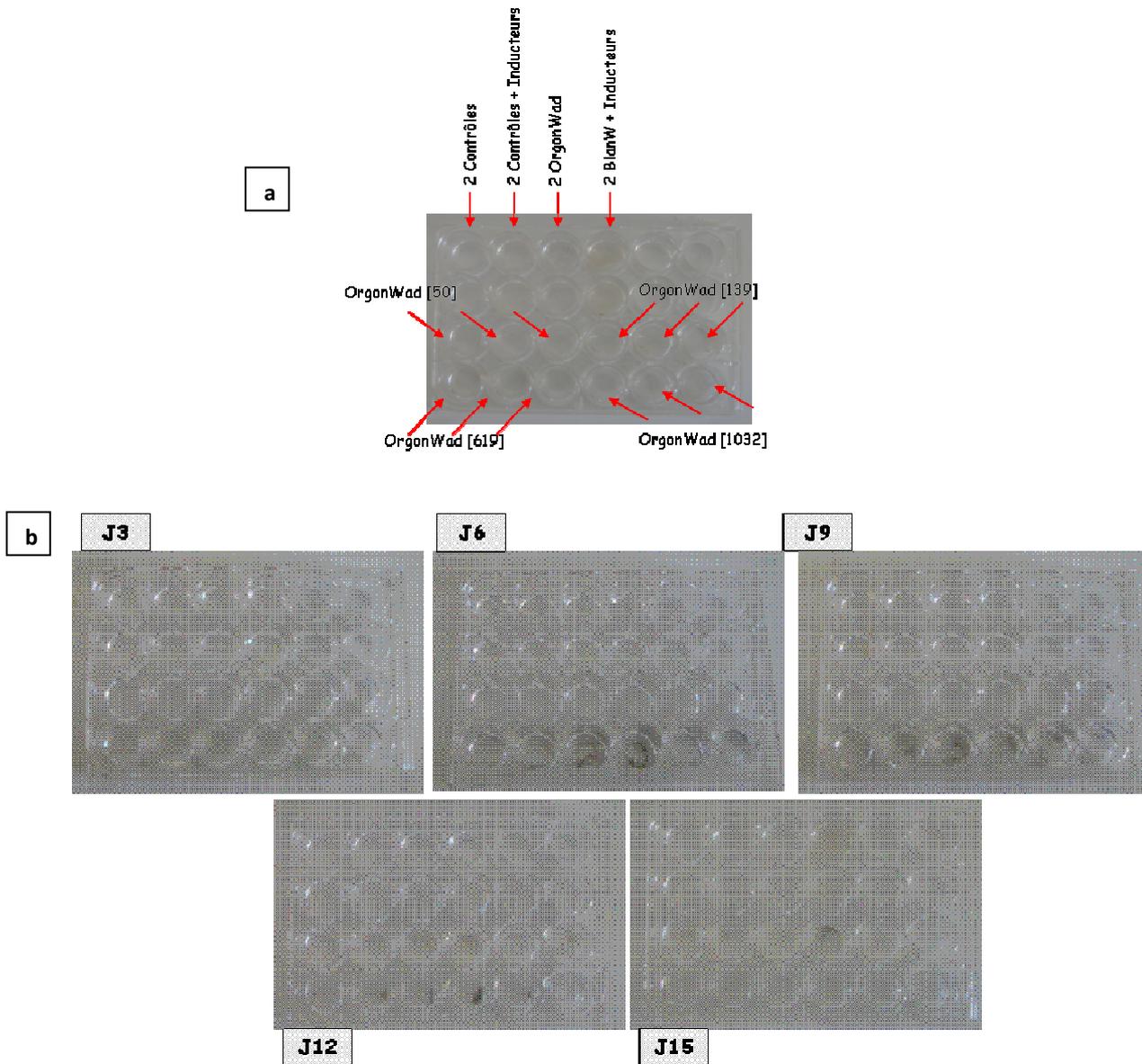


Annexe 1b. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des fibroblastes en réponse à l'extrait OrgonE à 219µg de protéines/ml (a), 799µg de protéines/ml (b) et 857µg de protéines/ml (c).

Annexe 2. Résultats des tests de minéralisation menés sur les pré-ostéoblastes, MC3T3-E1.

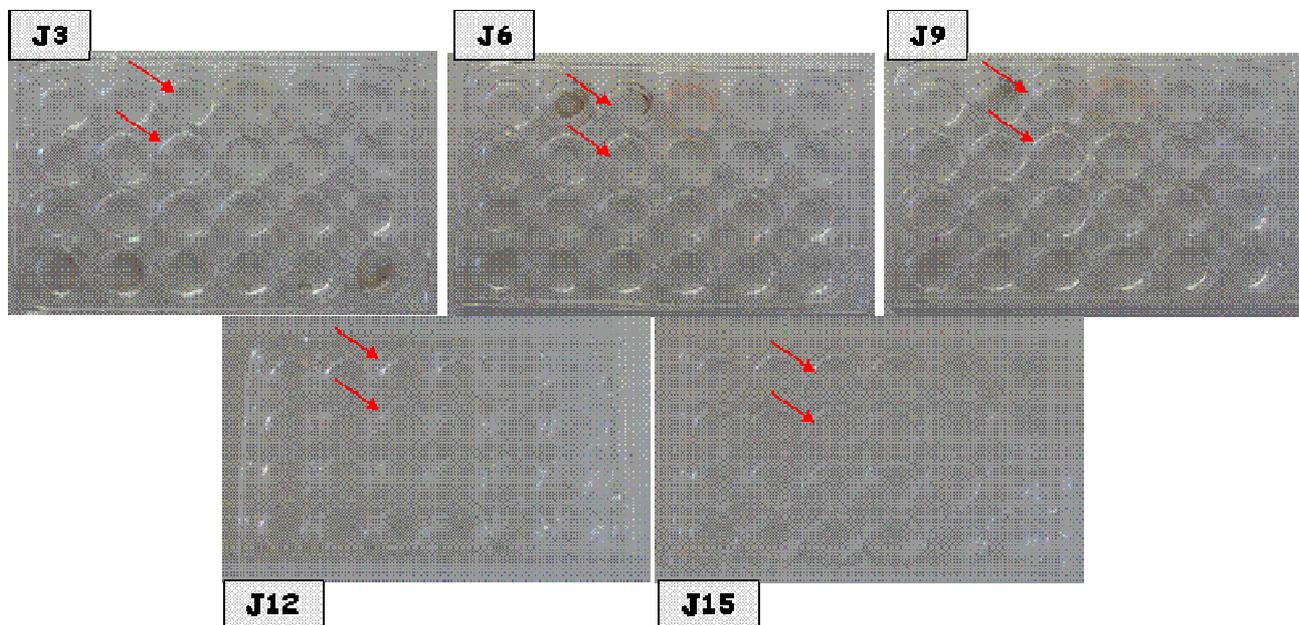


Annexe 2a. Résultats des tests de minéralisation menés sur les pré-ostéoblastes, MC3T3-E1, avec l'extrait OrgonW aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).

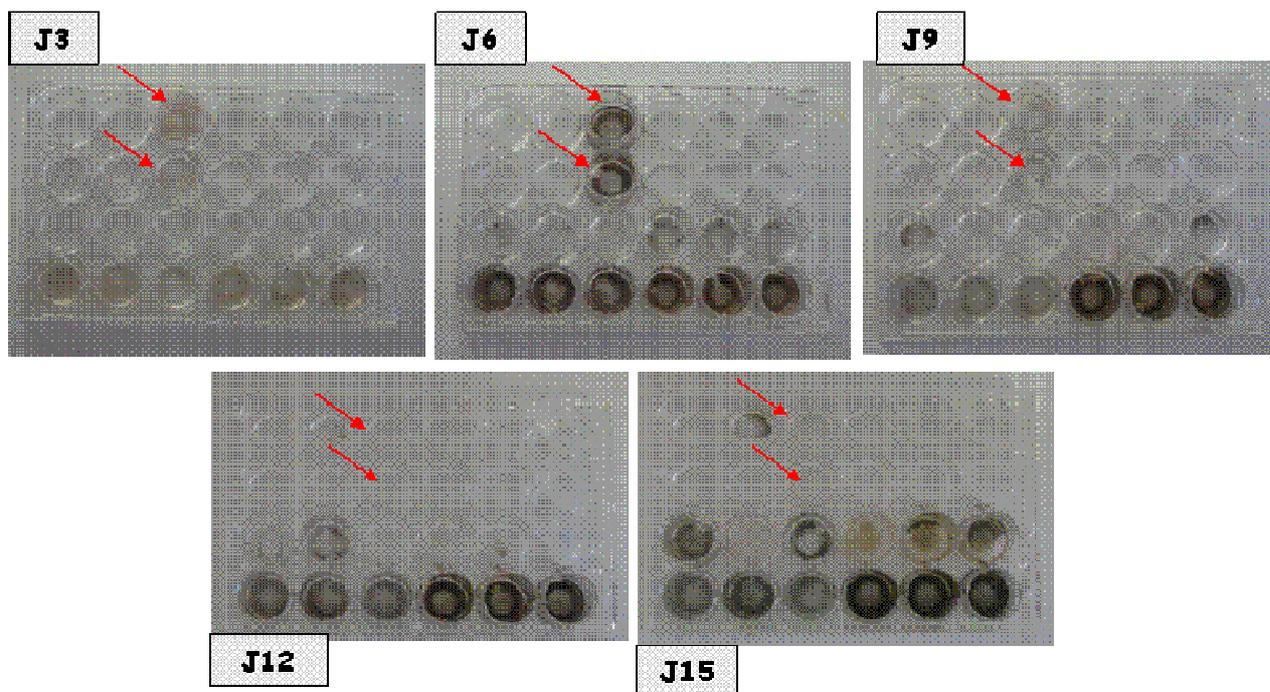


Annexe 2b. Résultats des tests de minéralisation menés sur les pré-ostéoblastes, MC3T3-E1, avec l'extrait OrgonWad aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).

Annexe 3. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules stromales pluripotentes de souris, D1 ORL UVA après ajout des blancs.

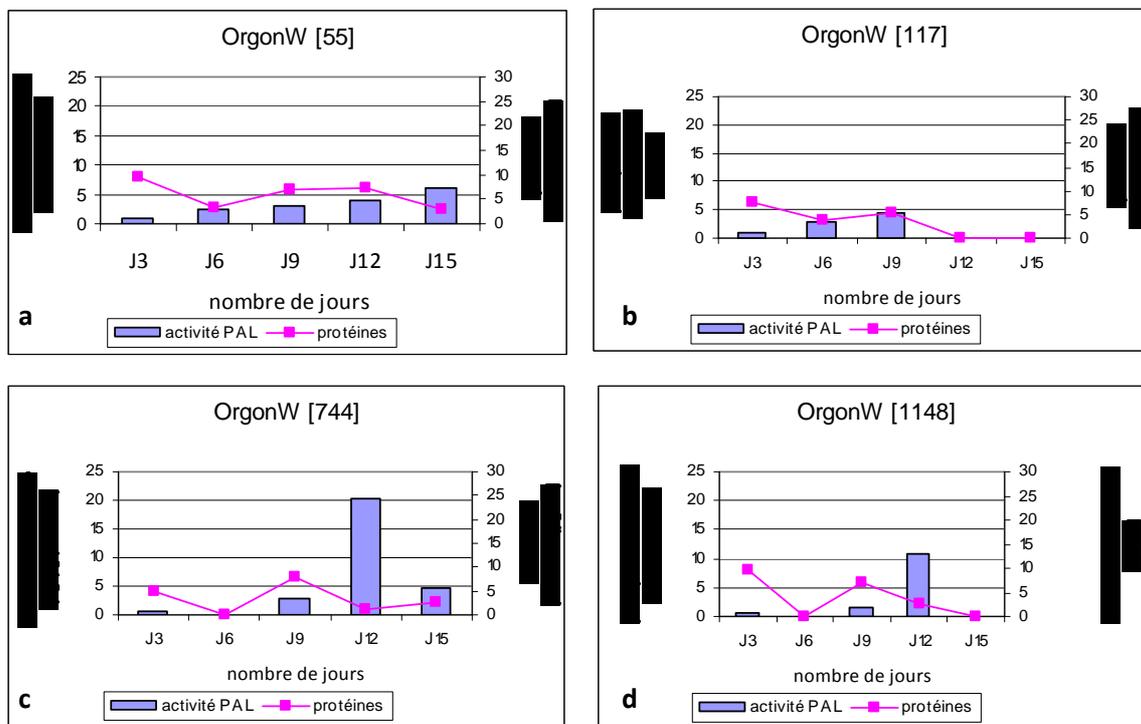


Annexe 3a. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec le blanc aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15. La position des différents extraits est indiquée par les flèches rouges.

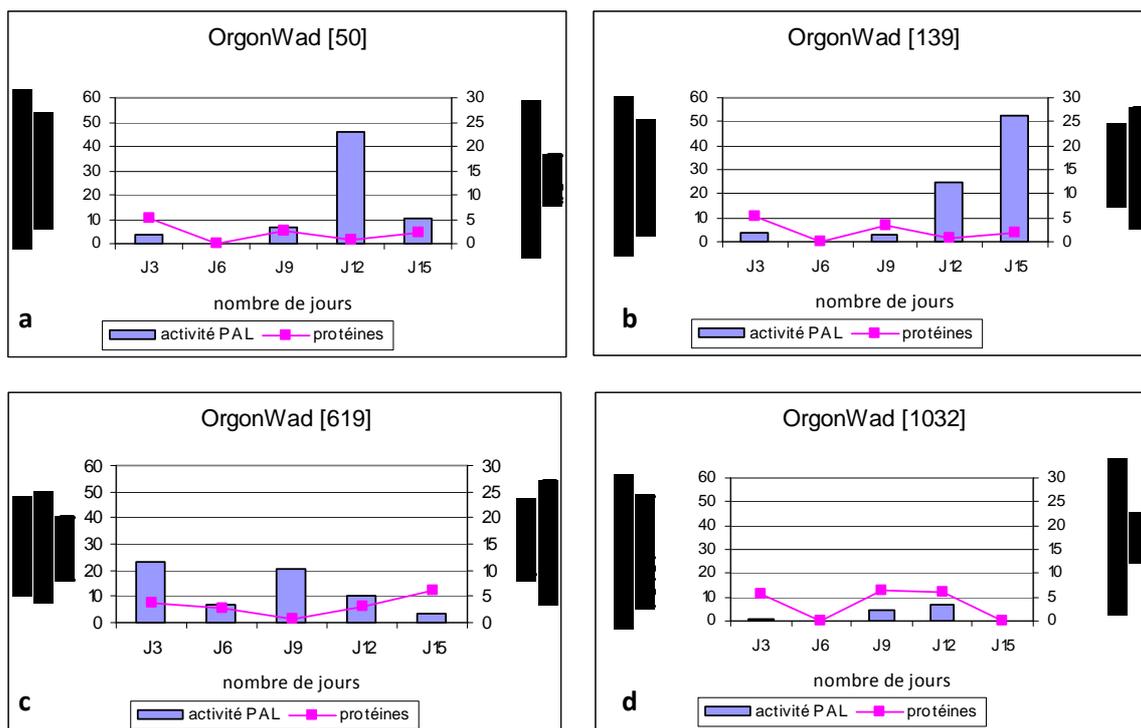


Annexe 3b. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec BlanE aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15. La position des différents extraits est indiquée par les flèches rouges.

Annexe 4. Résultats des dosages du taux de protéines, de l'activité PAL et du taux de collagène des cellules stromales pluripotentes de souris, D1 ORL UVA.

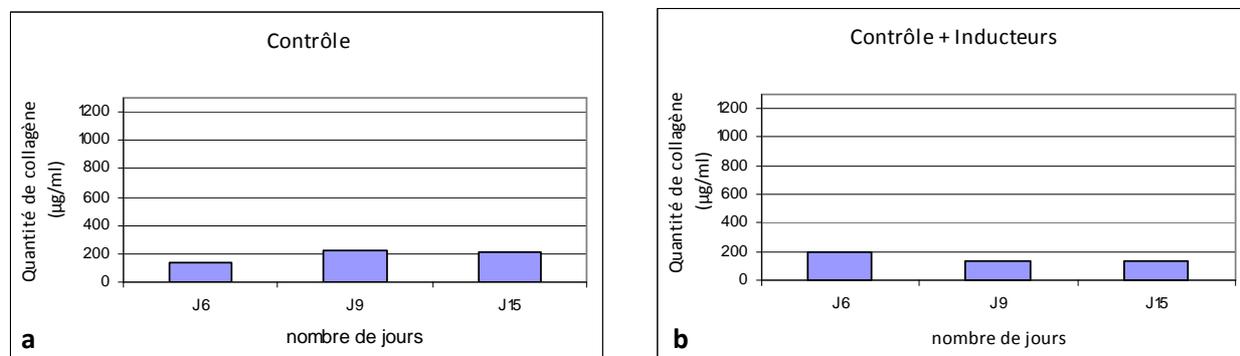


Annexe 4a. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonW à 55µg de protéines/ml (a), 117µg de protéines/ml (b), 744µg de protéines/ml (c) et 1148µg de protéines/ml (d).

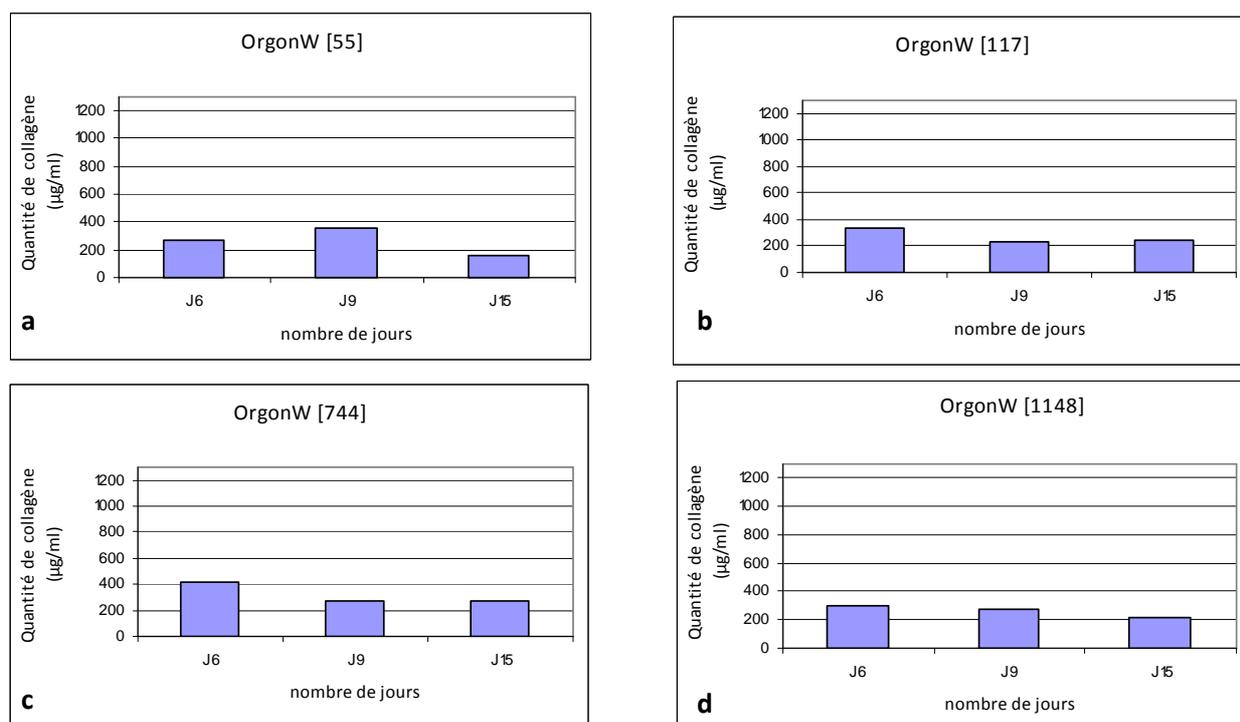


Annexe 4b. Evolution au cours du temps de l'activité PAL (histogramme) et de la quantité de protéines totales (courbe) des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonWad à 50 μ g de protéines/ml (a), 139 μ g de protéines/ml (b), 619 μ g de protéines/ml (c) et 1032 μ g de protéines/ml (d).

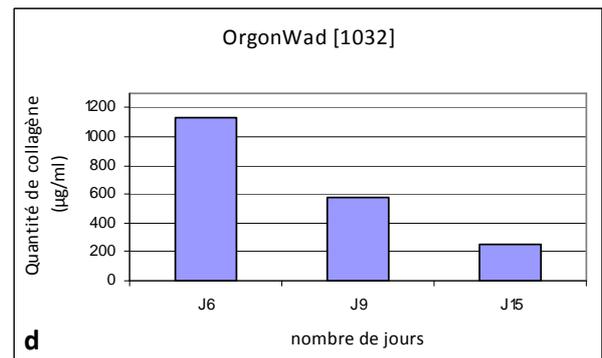
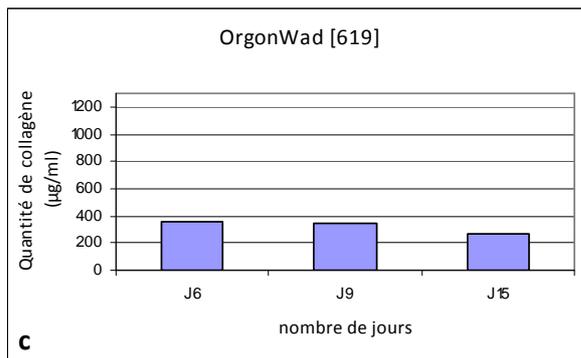
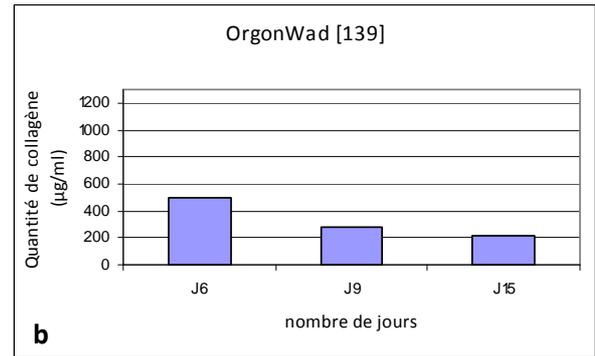
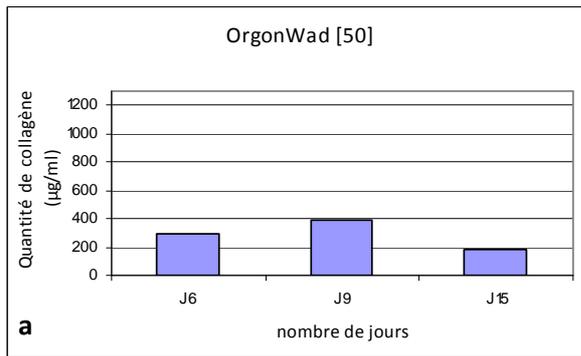
Annexe 5. Evolution en fonction du temps du taux de collagène des cellules stromales pluripotentes de souris, D1 ORL UVA.



Annexe 5a. Evolution au cours du temps du taux de collagène des cellules stromales pluripotentes en réponse au contrôle négatif (a) et au contrôle positif, la dexaméthasone (b).

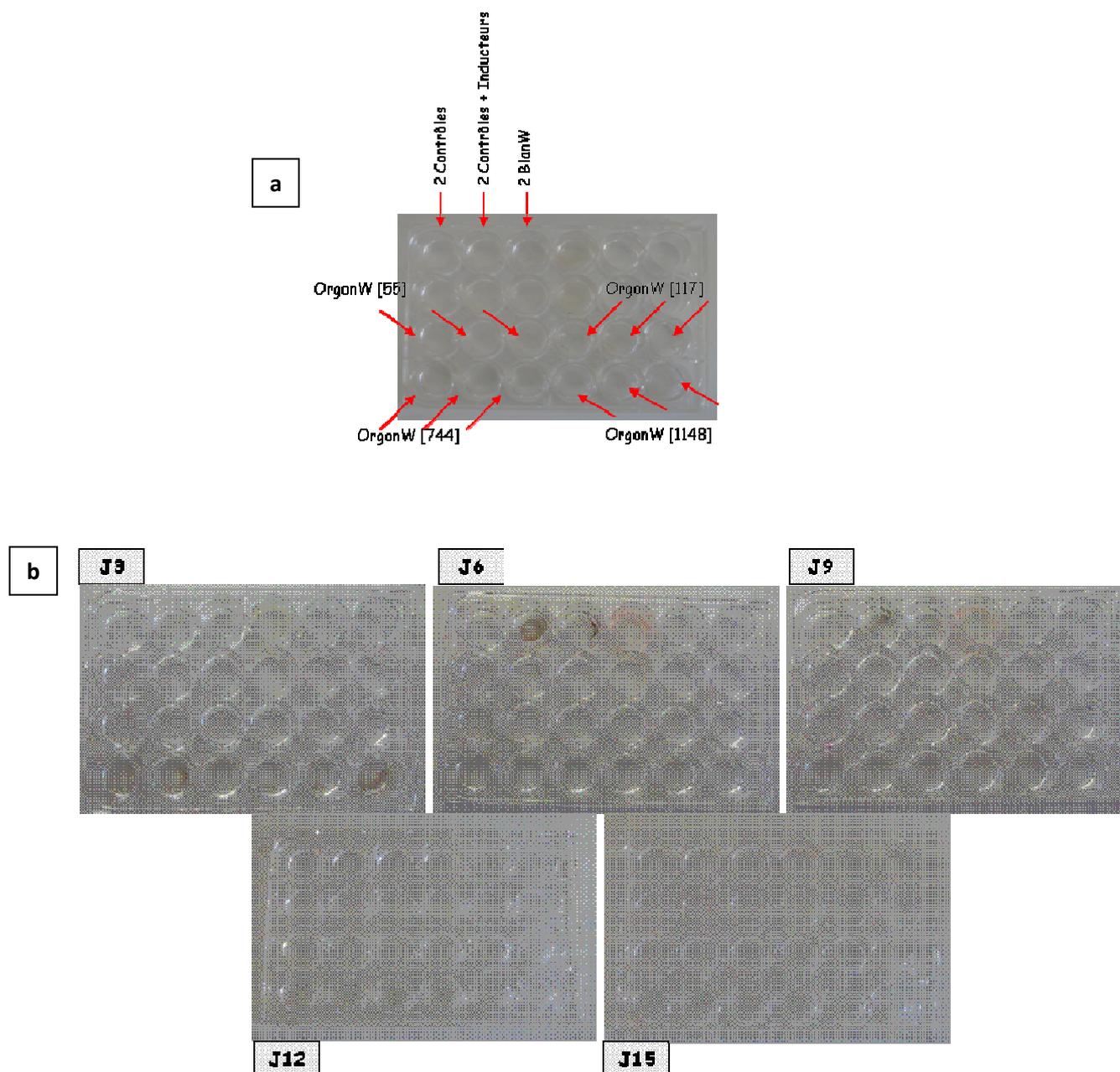


Annexe 5b. Evolution au cours du temps du taux de collagène des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonW à 55µg de protéines/ml (a), 117µg de protéines/ml (b), 744µg de protéines/ml (c) et 1148µg de protéines/ml (d).

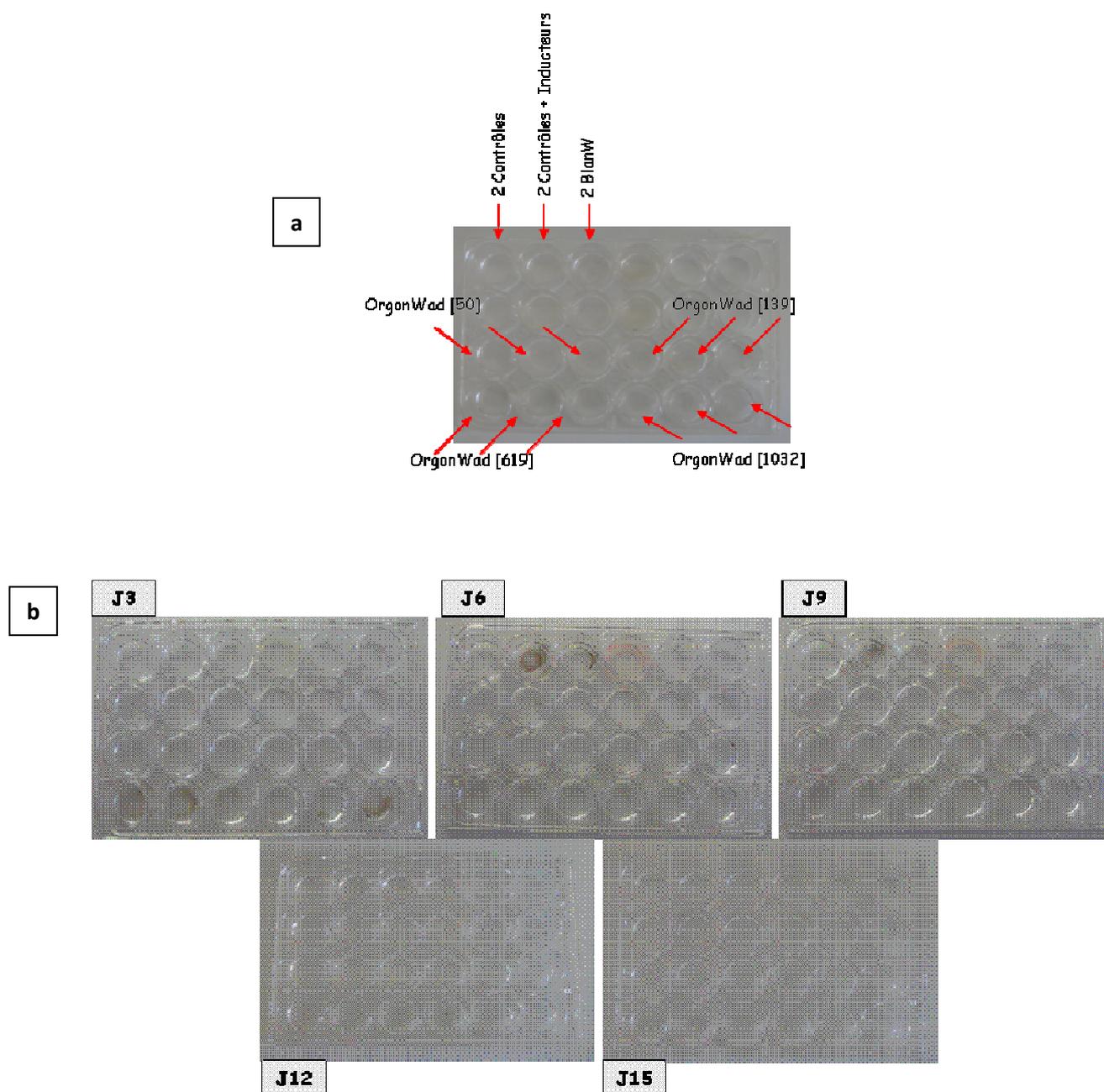


Annexe 5c. Evolution au cours du temps du taux de collagène des cellules stromales pluripotentes en réponse à l'extrait OrgonWad à 50µg de protéines/ml (a), 139µg de protéines/ml (b), 619µg de protéines/ml (c) et 11032µg de protéines/ml (d).

Annexe 6. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules stromales pluripotentes de souris, D1 ORL UVA après ajout des extraits OrgonW et OrgonWad.

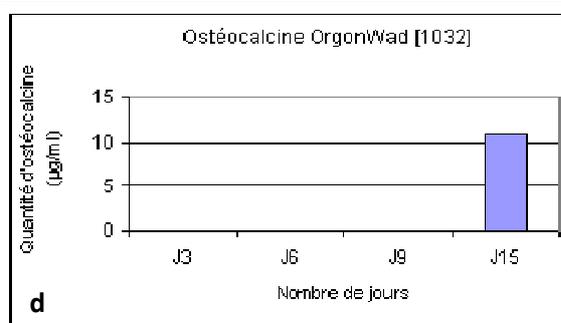
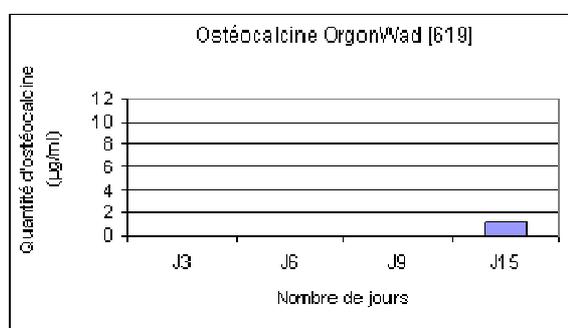
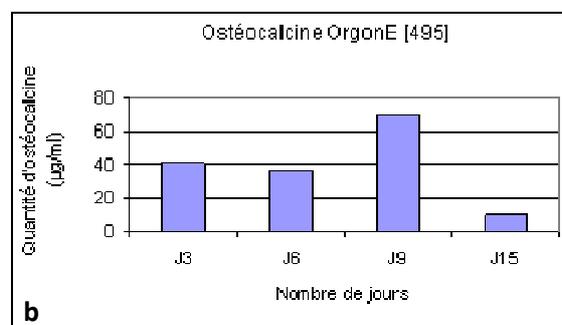
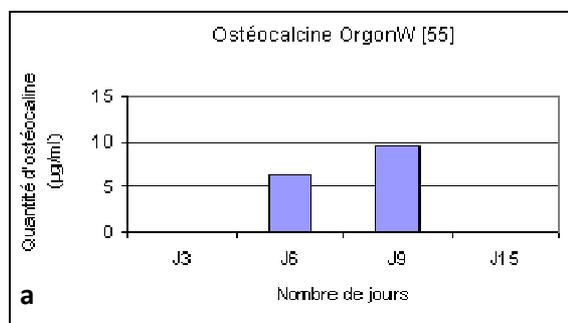


Annexe 6a. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec l'extrait OrgonW (b) aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).



Annexe 6b. Résultats des tests de minéralisation menés sur les cellules souches pluripotentes de souris, D1 ORL UVA, avec l'extrait OrgonWad (b) aux différentes concentrations à J3, J6, J9, J12 et J15 (b). La position des différents extraits est indiquée (a).

Annexe 7. Evolution en fonction du temps du taux d'ostéocalcine des cellules stromales pluripotentes de souris, D1 ORL UVA.



Annexe 6. Evolution au cours du temps du taux d'ostéocalcine des cellules stromales pluripotentes. Seuls les extraits ayant fournis des résultats positifs sont présentés : OrgonW à la concentration de 55µg de protéines/ml (a), OrgonE à 495µg de protéines/ml (b) et OrgonWad à 619g de protéines/ml (c) et 1032µg de protéines/ml (d).

Annexe 8. Signification des abréviations des acides aminés**Tableau des acides aminés**

Acide aminé	Code 3-lettres	Code 1-lettre	Polarité	Charge
Alanine	Ala	A	Non polaire	Neutre
Arginine	Arg	R	Polaire	Basique
Asparagine	Asn	N	Polaire	Neutre
Acide aspartique	Asp	D	Polaire	Acide
Cystéine	Cys	C	Non polaire	Neutre
Acide glutamique	Glu	E	Polaire	Acide
Glutamine	Gln	Q	Polaire	Neutre
Glycine	Gly	G	Non polaire	Neutre
Histidine	His	H	Polaire	Basique
Isoleucine	Ile	I	Non polaire	Neutre
Leucine	Leu	L	Non polaire	Neutre
Lysine	Lys	K	Polaire	Basique
Méthionine	Met	M	Non polaire	Neutre
Phénylalanine	Phe	F	Non polaire	Neutre
Proline	Pro	P	Non polaire	Neutre
Sérine	Ser	S	Polaire	Neutre
Thréonine	Thr	T	Polaire	Neutre
Tryptophane	Trp	W	Non polaire	Neutre
Tyrosine	Tyr	Y	Polaire	Neutre
Valine	Val	V	Non polaire	Neutre

Aurore DISSAUX

Etude et valorisation des principes actifs de biominéralisation du calcium pour les applications pharmaceutiques

L'environnement géologique a-t-il accumulé et conservé les molécules liées à la biominéralisation des carbonates qui forment les dépôts calcaires ? Si oui, ces molécules ont-elles conservé une activité biologique? La sédimentologie montre que la Provence possédait au Crétacé il y a 120 millions d'années, un rivage tropical bordé d'une plateforme carbonatée où se sont accumulés des biocalcaires d'une grande pureté comme à Orgon. Sur ce site, le calcaire piège les molécules organiques au cours de la diagenèse sous forme d'inclusions dans la calcite des rudistes (principaux producteurs de carbonates) grâce à un processus de dissolution/recristallisation centrifuge. Plusieurs modes opératoires ont été testés afin d'extraire ces molécules. Ils permettent d'obtenir deux grands types de complexes organo-minéraux: un extrait plutôt lipidique, obtenu essentiellement à l'alcool et l'autre plutôt protéique obtenu à l'eau. Leur activité a ensuite été testée sur la peau et sur l'os. L'activité dermatologique est démontrée sur des explants de peau humaine maintenus en survie. On observe un renouvellement de l'épiderme dès 9 jours sans dérèglement, une restructuration de la jonction dermo-épidermique et dans le derme un réseau de collagène densifié ainsi que la production d'acide hyaluronique. Sur l'os, les extraits ont stimulé la différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique et également le dépôt d'hydroxyapatite à partir de culture de cellules souches. Ce travail démontre que des molécules vieilles de 120 millions d'années sont préservées, exploitables et qu'elles possèdent une série d'activités à visée thérapeutique sur la peau et sur l'os.

Mots clés : Biominéralisation, calcium, polypeptides, lipides, principes actifs, peau, cellules osseuses, cosmétique, pharmaceutique, Crétacé

Study and Development of the actives from the biomineralization of calcium for pharmaceutical applications

Did the geological environment accumulate and conserve molecules related to the biomineralization of carbonates? If so, did these molecules retain their biological activity? Sedimentology shows that Provence owned during Cretaceous, 120 million years ago, a tropical shore surrounded by a carbonated platform where biolimestones of high purity accumulated such as in Orgon. In this site, limestone trapped the organic molecules during diagenesis as inclusions in rudist's calcitic shell (major producers of carbonates) through a process of dissolution / recrystallization centrifuge. Several protocols were tested to extract these molecules. It provides two main types of organo-mineral complex: an extract rather lipidic, obtained mainly with alcohol and another one rather proteinic obtained with water. Their activity was then tested on skin and bone. The dermatological activity was demonstrated on human skin explants maintained in survival. We observed the renewal of the epidermis in 9 days perfectly regulated, the restructuring of the dermo-epidermal junction and, in the dermis, the densification of the collagen network and hyaluronic acid production. On bone, the extracts stimulated the differentiation of the osteoblast lineage cells and also deposits of hydroxyapatite from stem cells cultures. This work has demonstrated that molecules as old as 120 million years are preserved, exploitable and own a series of therapeutic activities on the skin and bone.

Keywords: Biomineralization, calcium, polypeptides, lipids, actives, skin, bone cells, cosmetic, pharmaceuticals, Cretaceous.



Institut des Sciences de la Terre d'Orléans
UMR 6113 - CNRS/Université d'Orléans
1A rue de la Férollerie
45071 Orléans cedex 2

