

**Minéralisations induites *in vitro*
par les molécules organiques de la nacre:
variations observées au MEB
suivant les types cellulaires.**

Marthe ROUSSEAU

*UMR7561 CNRS, Nancy University,
9 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre, France*

Contexte



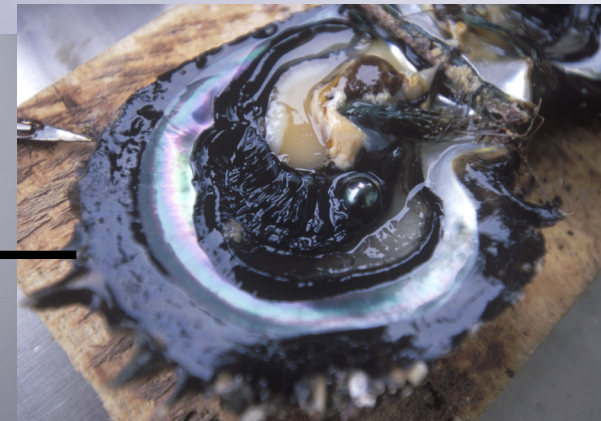
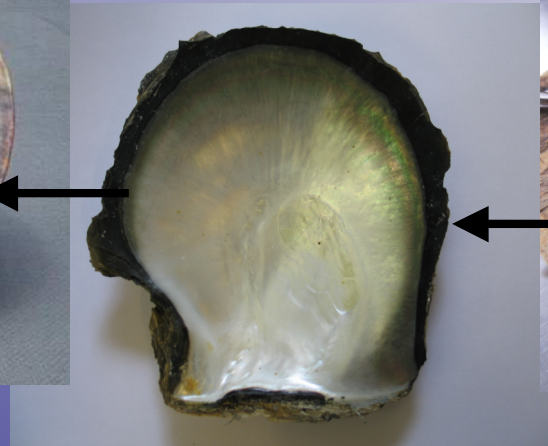
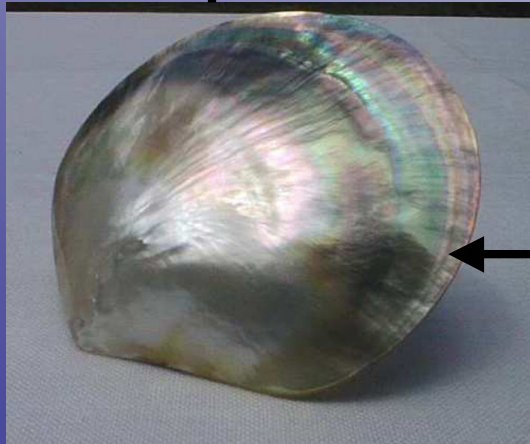
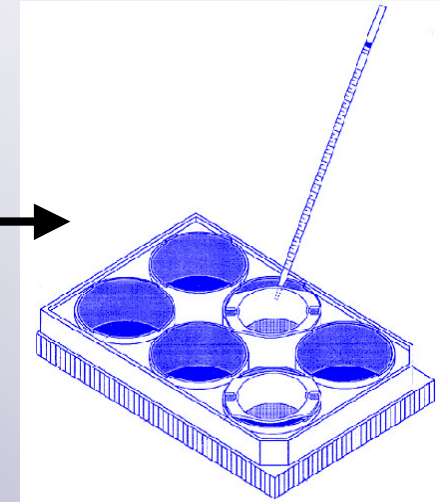
Pinctada margaritifera

Nacre de *Pinctada margaritifera*, MEB

Un biominéral: la nacre

- partie interne de la coquille des mollusques nacriers
- biominéral particulier: structuré en tablettes polygonales d'aragonite (CaCO_3) et de matière organique

Extraits organiques de la nacre



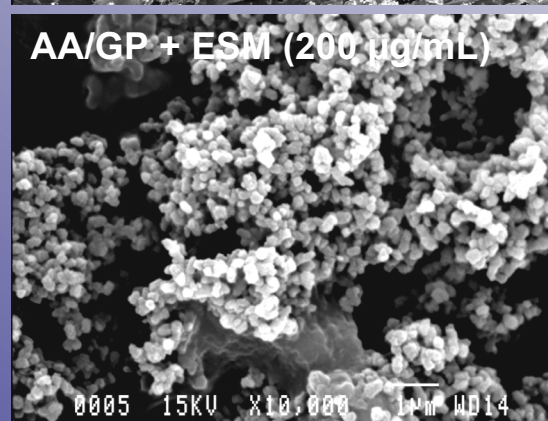
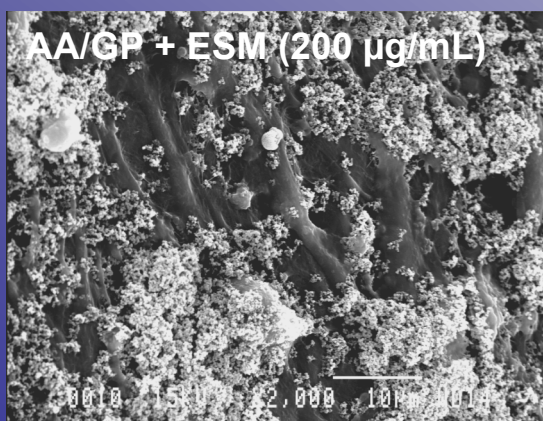
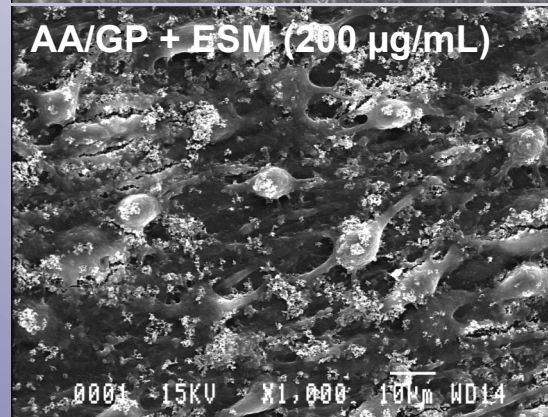
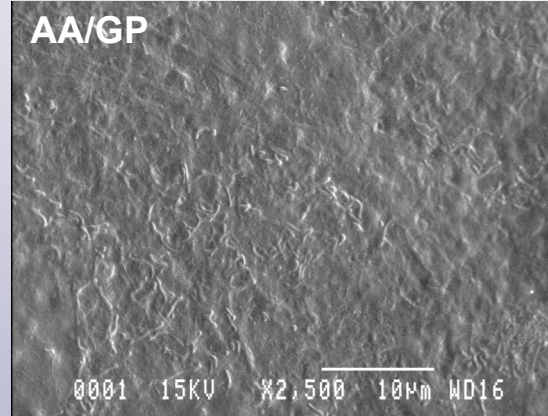
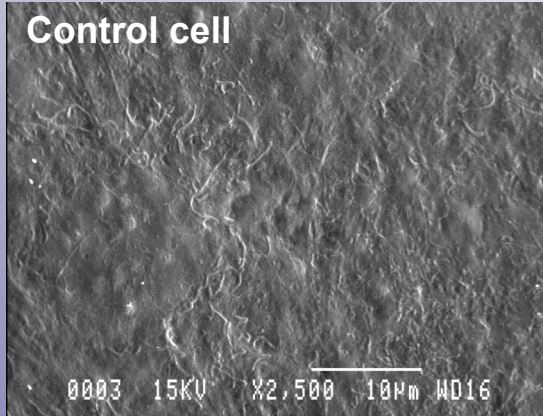
MC3T3

Cellules MC3T3: lignée cellulaire immortalisée (souris) de pré-ostéoblastes

Molécules testées: extraits organiques de nacre

Objectif: induction de la différenciation et de la minéralisation

Après 16 jours de culture



MEB:

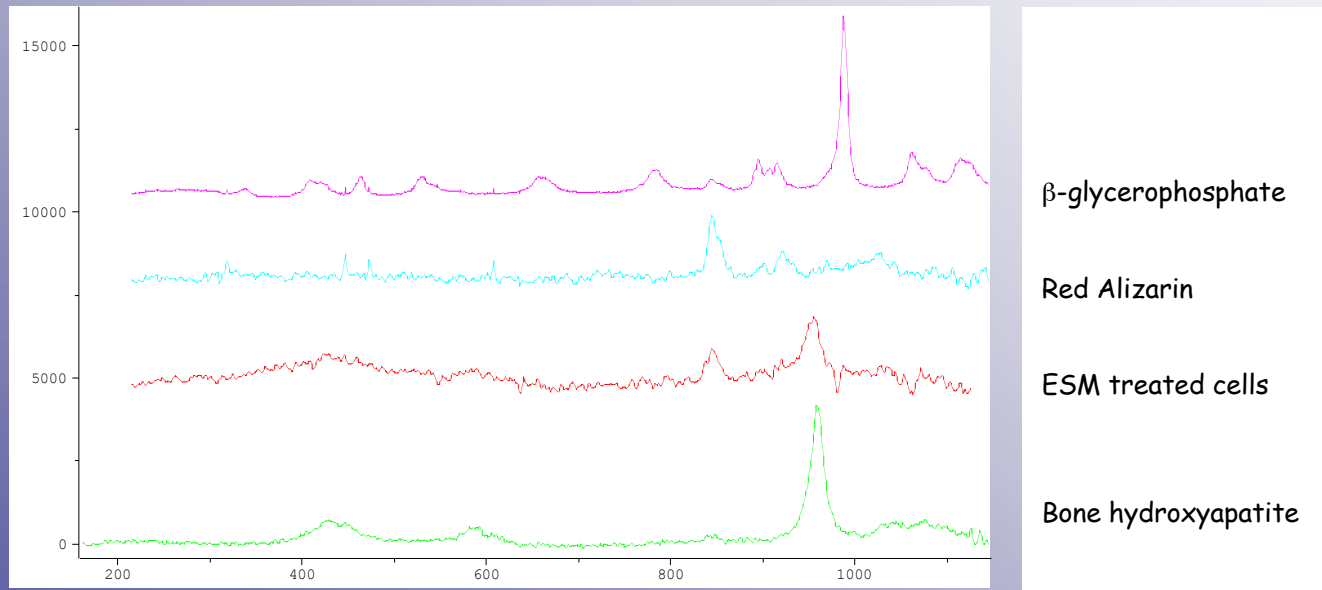
JEOL JSM-840 A

15kV

Lower detector

Muséum National
d'Histoire
Naturelle, Paris

Dépôt d'Hydroxyapatite à la surface des cellules après 21 jours de culture



Spectroscopie Raman



Formation de nodules de minéralisation:

Hydroxyapatite

Protocole utilisé

1. Lavage du tapis cellulaire PBS
2. Fixation avec 1% glutaraldehyde (30min) dans tampon Na/diK (0,15M)
3. Rinçage 3x avec tampon Na/diK (0,15M)
4. Rinçage H₂O
5. Déshydratation douce et progressive à l'éthanol (30%, 50%, 70%, 95%, 100%)
6. Point critique
7. Métallisation

! Utiliser si possible des labtecks verre

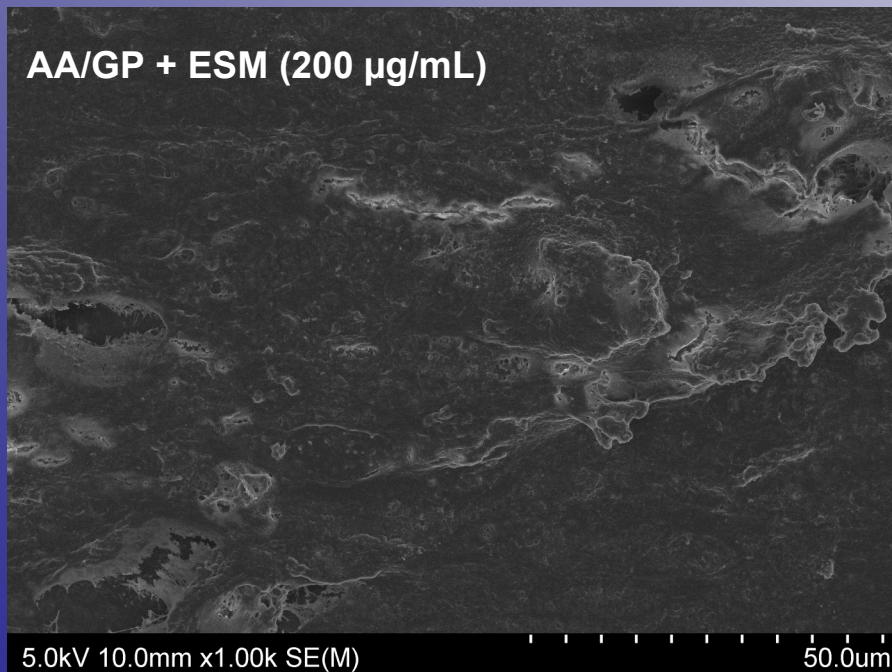
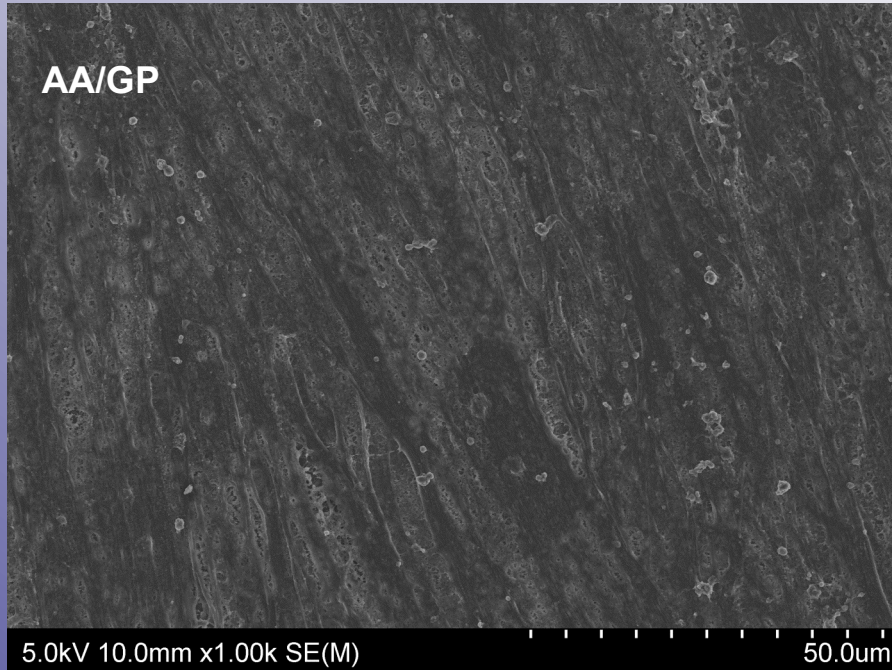
Ostéoblastes humains

Ostéoblastes humains: ostéoblastes en culture primaire à partir de déchets chirurgicaux (pose d'une prothèse du genou)
Patient arthrosique
Cellules pathologiques ayant des difficultés à minéraliser

Molécules testées: extraits organiques de nacre

Objectif: rétablir la minéralisation

Après 21 jours de culture



MEB:

Hitachi FEG S4800

5kV

**Service Commun de Microscopies
Electroniques et
de Microanalyses X,
Faculté des Sciences, Nancy**

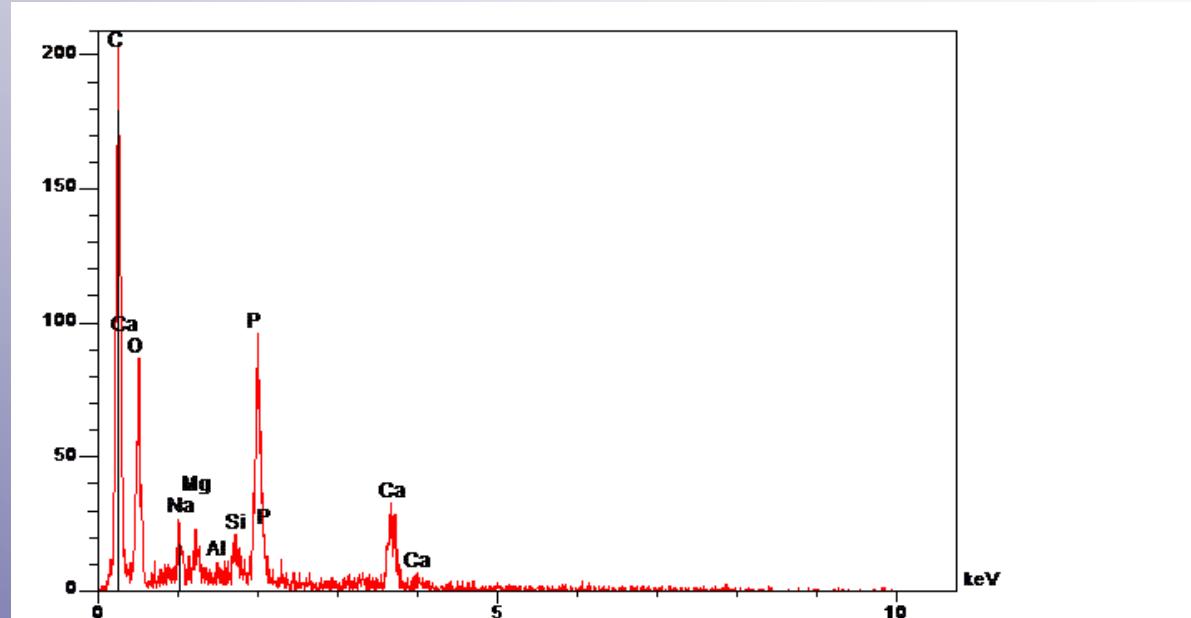
Analyse EDS

EDS:

Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

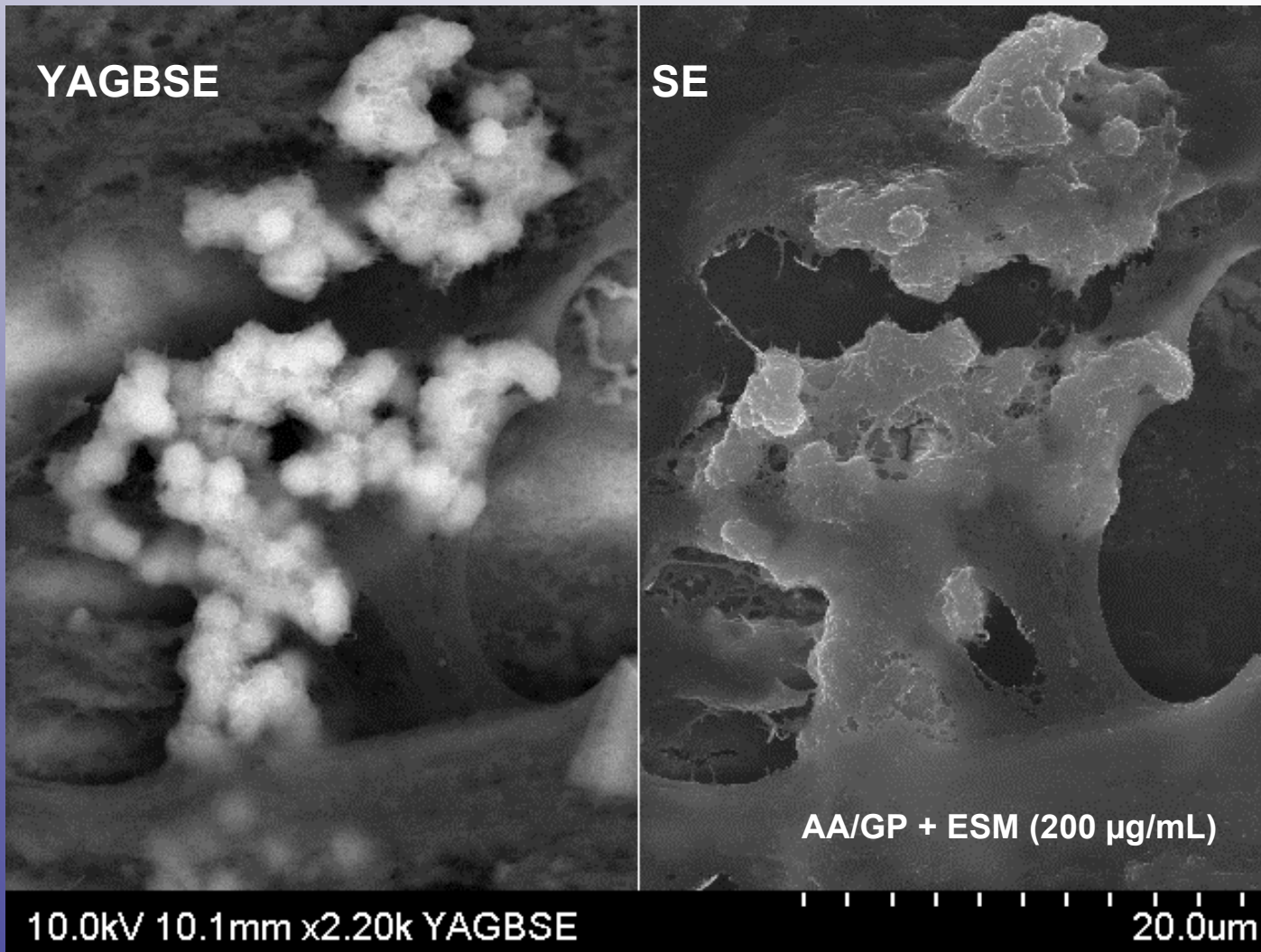
Spectromètre à dispersion d'énergie

Service Commun de
Microscopies
Electroniques et
de Microanalyses X,
Faculté des Sciences,
Nancy



Conditions d'analyse

Tension d'accélération):	10.0
Grandissement:	11000



SE: Scanning Electron microscopy

YAGBSE: mode backscattered electron: l'image est formée à partir des électrons rétrodiffusés. Le contraste est dépendant de la morphologie de l'échantillon et du numéro atomique.

Protocole utilisé

1. Lavage du tapis cellulaire PBS
2. Fixation avec ethanol 70%
3. Déshydratation progressive à l'éthanol (70%, 95%, 100%)
4. Métallisation

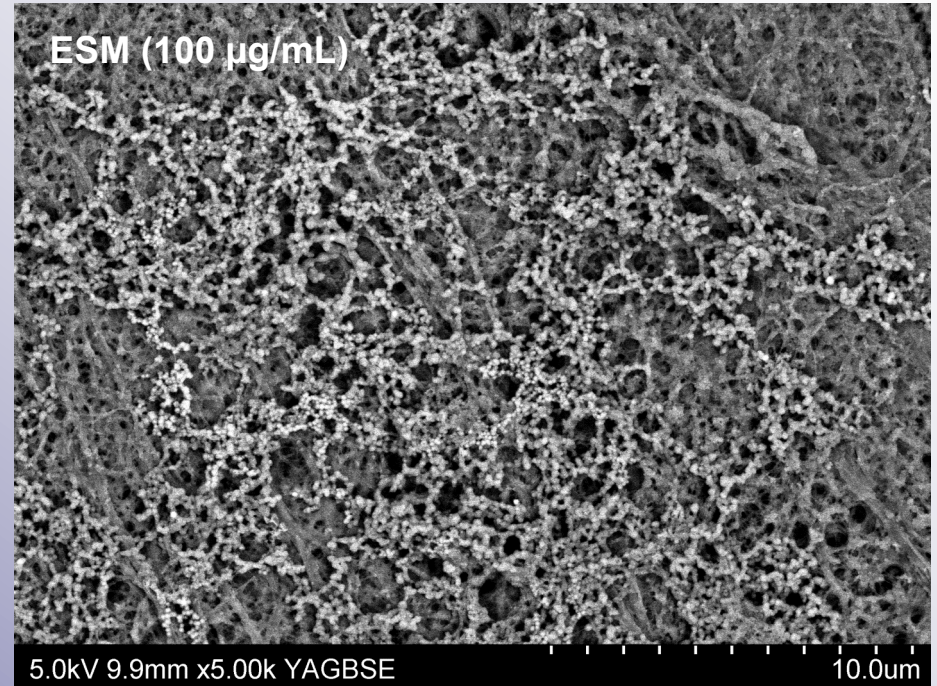
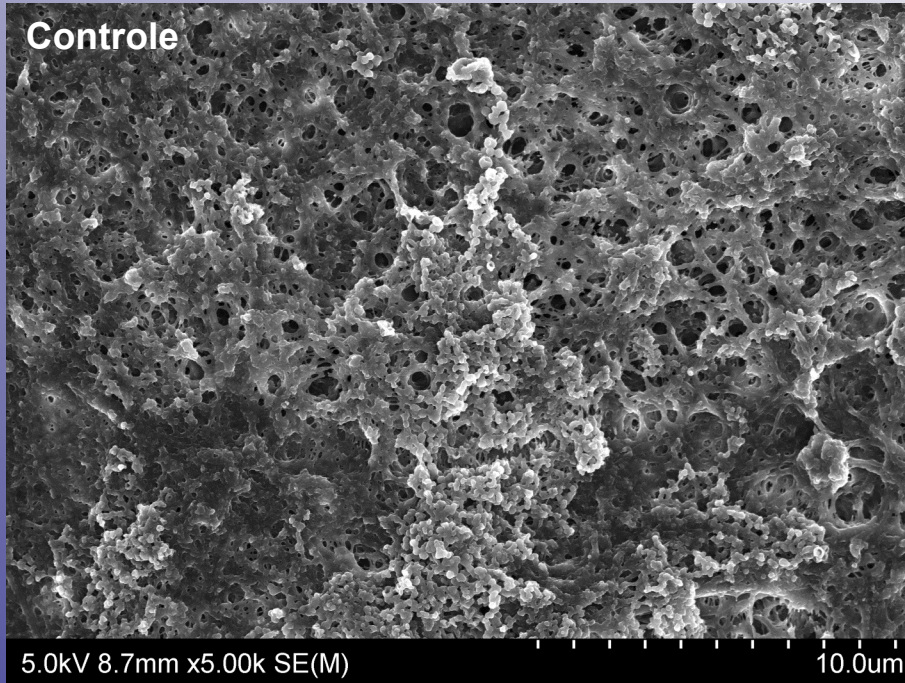
ATDC5

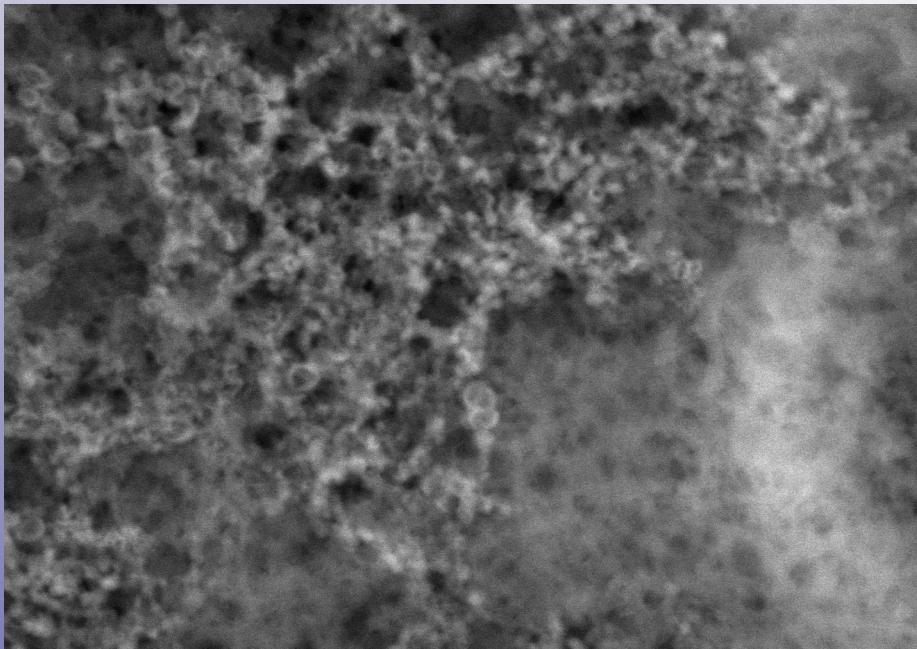
Cellules ATDC5: lignée cellulaire immortalisée (souris)
chondrogénique

Molécules testées: extraits organiques de nacre

Objectif: induire la différenciation et la minéralisation

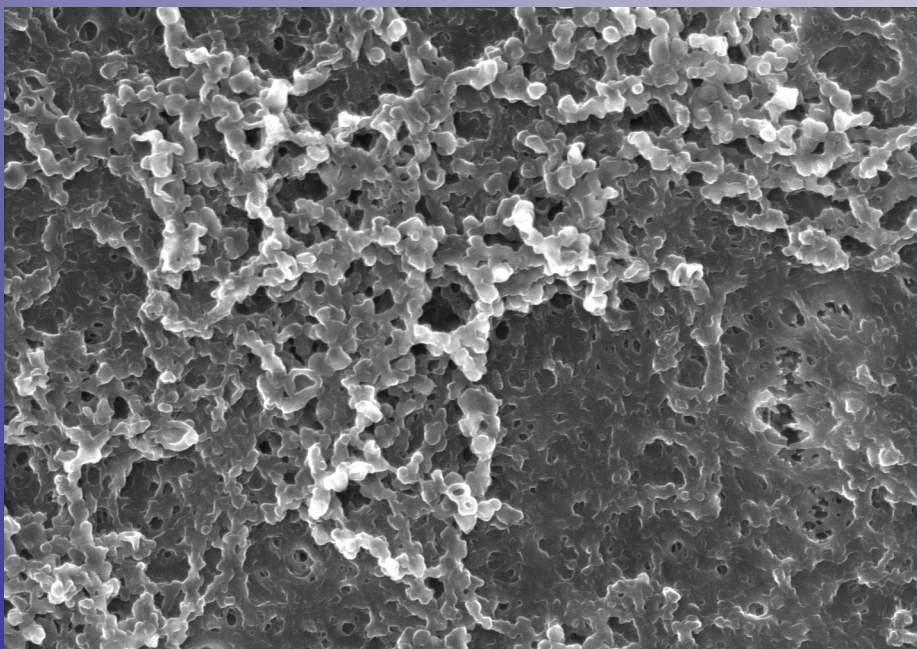
Après 14 jours de culture





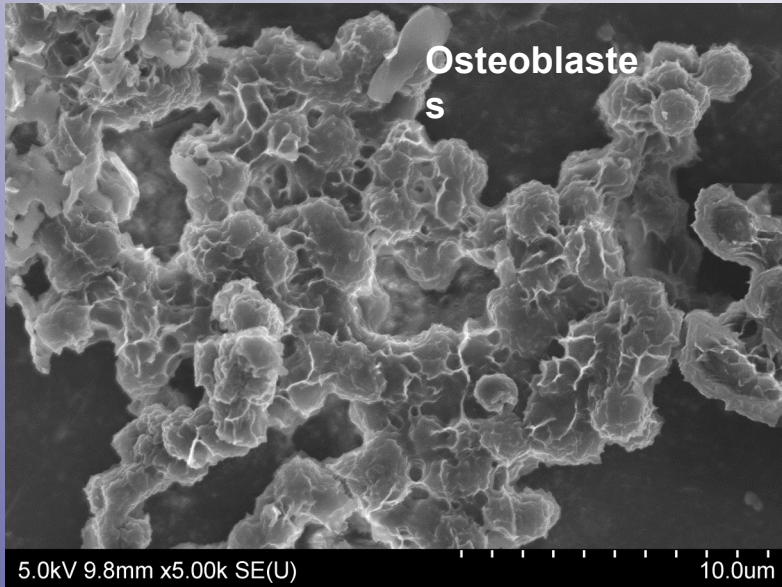
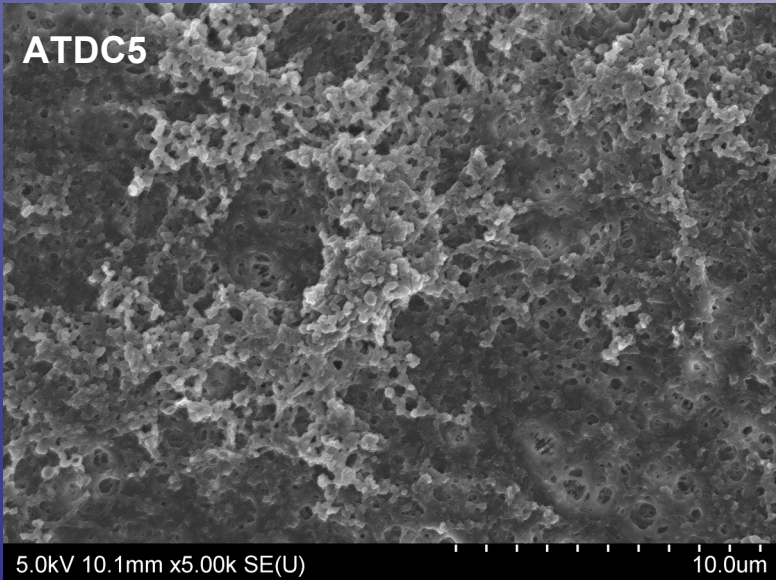
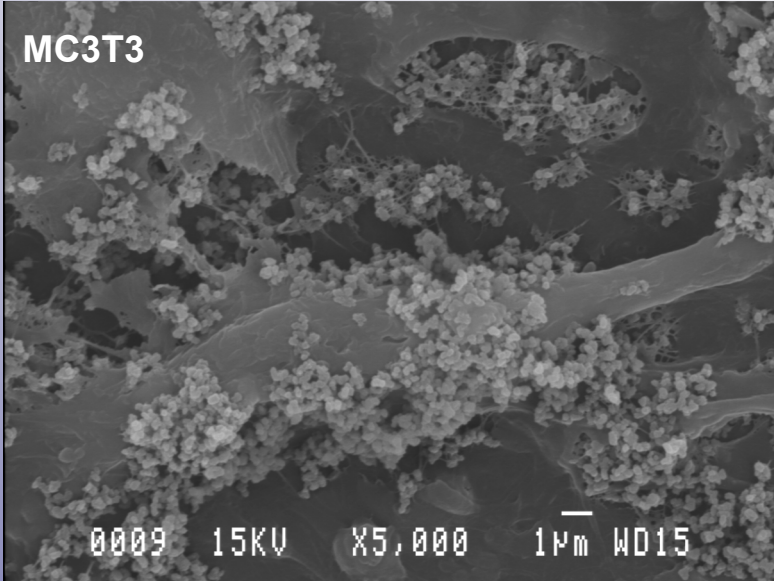
Après 7 jours de culture

YAGBSE



SE

Comparison



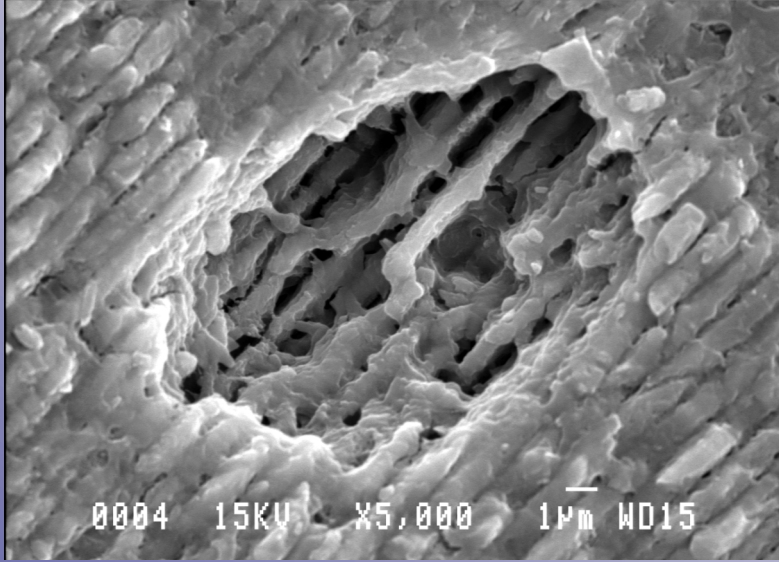
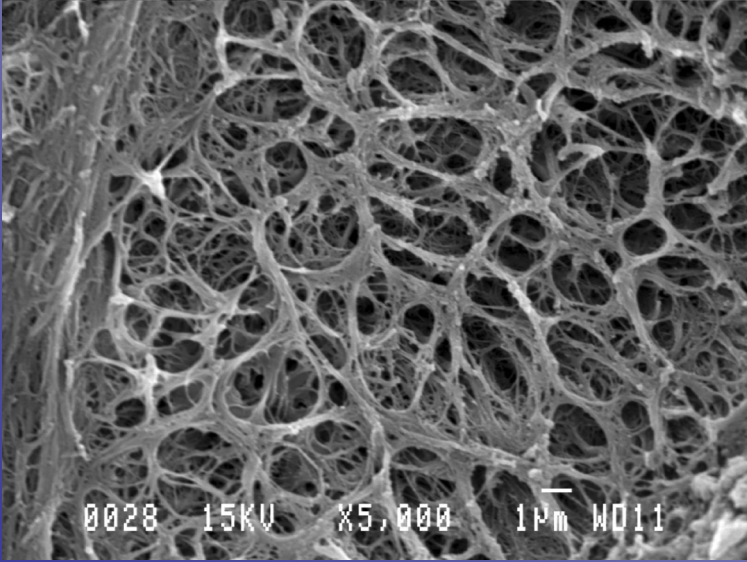
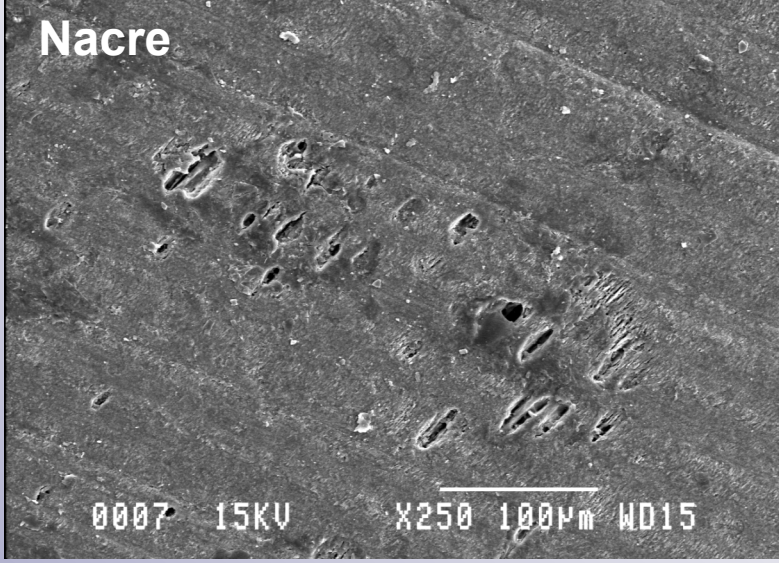
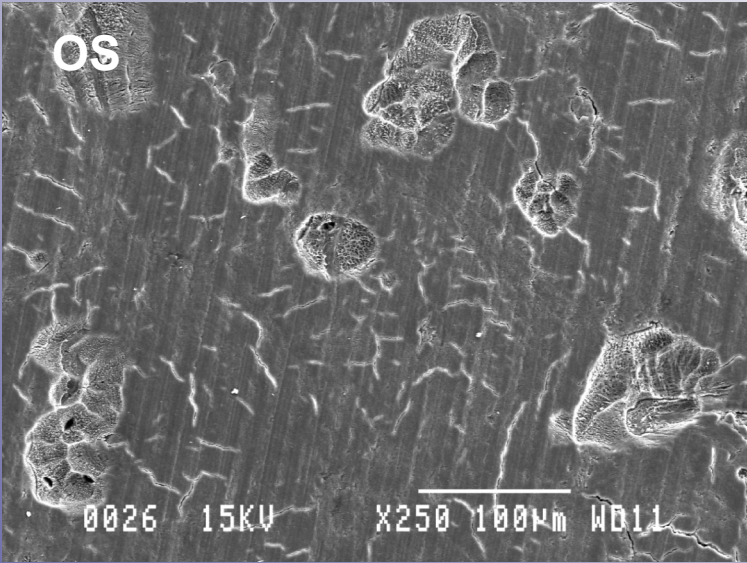
Osteoclastes

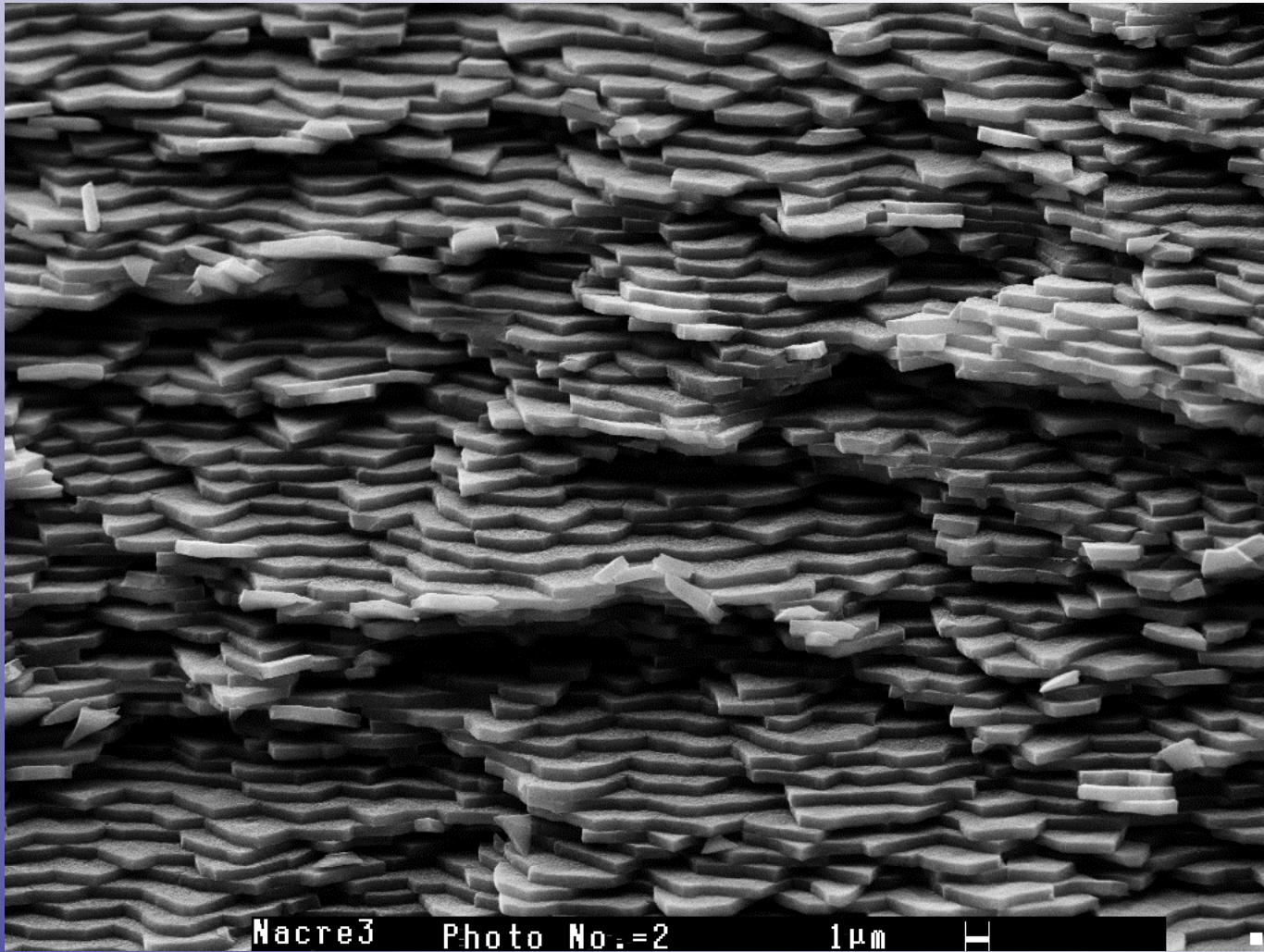
Osteoclastes: ostéoclastes différenciés à partir de CD14+ monocytes (issus du sang humain)

Sur la nacre

Objectif: dégradation de la nacre par les ostéoclastes

Dégradation ostéoclastique





Merci de votre attention